

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ÜLDISE JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

12 EAP

Joosep Paats

Rekombinatiivse helikaasi Irc3 C- ja N-terminaalsete domeenide funktsioonide analüüs

Bakalaureusetöö

Juhendajad M.Sc Ilja Gaidutšik,

prof. Juhan Sedman

TARTU

2016

Rekombinatiivse helikaasi Irc3 C- ja N-terminaalsete domeenide funktsioonide analüüs

Bakalaureusetöö

Joosep Paats

Lühikokkuvõte. Mitokondriaalse DNA terviklikkus on vajalik aeroobseks hingamiseks. *S. cerevisiae* tuuma genoomilt kodeeritavad valgud on vajalikud mitokondriaalse DNA metabolismiks, nende hulgas ka helikaasid. DExH/D-box perekonna helikaas Irc3 on otseselt seotud *S. cerevisiae* mitokondriaalse DNA metabolismiga. Helikaaside lisadomeenid varieeruvad funktsioonilt ning struktuurilt. Antud töö eesmärk oli teostada Irc3 valgu N- ja C-terminaalsete domeenide biokeemiline analüüs. Tööst selgus, et Irc3 valgu N-terminaalne domeen on DNA poolt stimuleeritud ATP hüdrolyüsamise aktiivsusega, kuid C-terminaalne domeen mitte. C-terminaalne domeen seondus Holliday ühendust meenutava substraadiga sarnase afiinsusega kui metsiktüüpi Irc3 valk, kuid N-terminaalne domeen antud katsesüsteemis DNA-d märgatavalt ei sidunud.

CERCS teaduseriala: P310 Proteiinid, ensüümid.

Märksõnad: Irc3, helikaas, mitokonder, biokeemiline analüüs, valgu puhastamine.

Functional analysis of the N- and C-terminal domains of the recombinative helicase Irc3

Bachelor's thesis

Joosep Paats

Abstract. Integrity of mitochondrial DNA is essential for aerobic respiration of the cells. The nuclear genome encodes a number of proteins that are involved in mitochondrial DNA metabolism. Helicase Irc3, encoded by the nuclear genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is directly involved in mitochondrial DNA metabolism. Auxiliary domains of helicases vary in function and structure, depending of the particular helicase. The aim of this work was to study the functions of Irc3 N- and C-terminal domains. The study showed that N-terminal mutants of Irc3 had DNA stimulated ATPase activity while the C-terminal mutants did not.; the N-terminal part did not bind DNA in our assay system and the C-terminal part had approximately same affinity for the DNA as the full-length Irc3 protein.

CERCS research specialization: P310 Proteins, enzymes.

Keywords: Irc3, helicase, mitochondrion, biochemical analysis, protein purification.

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Helikaasid	6
1.1.1 Superperekond II helikaasid	9
1.1.2 Superperekonnas II leiduvad lisadomeenid	12
1.1.3 Helikaaside funktsioonid organismides	15
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ja selle mtDNA	16
1.3 Irc3	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
1.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja metoodika	20
2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid	20
2.2.2 Söötmel ja kasvutingimused	21
2.2.3 PCR reaktsioonid	22
2.2.4 Agaroosgeelelektroforees (AGE)	23
2.2.5 Ekspressioonivektorite konstrueerimine	24
2.2.6 Valkude ekspressioon	26
2.2.7 Valkude puhastamine	27
2.2.8 Valguanalüüs	30
2.3 Tulemused	34
2.3.1 $\Delta 28$ IRC3 mutantsete ekspressioonivektorite loomine	34
2.3.2 Valkude ekspresseerimine	37
2.3.3 Valkude puhastamine suures mahus	38
2.3.4 ATP hüdrolyüsamise aktiivsus	40
2.3.5 DNA sidumisvõime	41
2.4 Arutelu	43
KOKKUVÕTE	46
Functional analysis of the N- and C-terminal domains of the recombinative helicase Irc3	47
KIRJANDUSE LOETELU	49
LISAD	60

KASUTATUD LÜHENDID

AGE – agarosgeelelektroforees

Amp – ampitsilliin

Cam – klooramfenikool

CARD - kaspasi aktiveerivad domeenid (*caspase activation and recruitment domain*)

cpm – impulssi minutis (*counts per minute*)

ddH₂O - kahekordselt destilleeritud vesi.

dsRNA- kaheaheelaline RNA (*double stranded ribonucleic acid*)

DTT – ditiotreitol

EB – elueerimispuhver (*eluation buffer*)

GST FF - glutatioon agaros suspensioon (*Glutathione SepharoseTM 4 Fast Flow*)

HJ – Holliday ühendus (*Holliday junction*)

mtDNA- mitokondriaalne DNA (*mitochondrial DNA*)

NA- nukleiinhape (*nucleic acid*)

NTP – nukleosiid 5'-trifosfaat (*nucleoside 5'-triphosphate*)

ON – üleöö (*over night*)

PAGE – polüakrüülamiidgeel elektroforees

rpm – pööret minutis (*rotations per minut*)

RRM – RNA tuvastus motiiv (*RNA recognition motif*)

RT – toatemperatuuril – (*room temperature*)

SF- superperekond (*superfamily*)

ssDNA – üheaheelaline DNA (*single stranded DNA*)

ssNA- üheaheelaline nukleiinhape (*single stranded nucleic acid*)

YFP – kollaselt fluorestseeruv valk (*yellow flourescent protein*)

SISSEJUHATUS

Mitokondrid on kahemembraansed pooleldi iseseisvad rakuorganellid, mida leidub peaaegu kõigis eukarüootides ning lisaks teistele funktsioonidele on neil rakuorganellidel keskne koht aeroobses hingamises ja oksüdatiivses fosforüleerimises. Mitokondris paiknevatest valkudest 1% on kodeeritud mitokondriaalse DNA poolt ning ülejäänud valgud on kodeeritud tuumagenoomi poolt ja transporditud translatsioonijärgselt mitokondrisse. Tuumagenoomilt kodeeritavad valgud on absoluutselt vajalikud mitokondri korrektseks funktsioneerimiseks ja oma füsioloogilise rolli täitmiseks. Tuumagenoomilt kodeeritud mitokondriaalse transpordisignaali valkude hulgas on ka mitokondriaalse DNA replikatsiooni ja DNA reparatsiooni osalevad valgud, nende seas ka helikaasid.

Mitokondrile on omane eraldiseisev nukleoididesse pakitud eraldiseisev genoom, mis kodeerib hingamisahela toimimiseks absoluutselt vajalikke komponente. *Saccharomyces cerevisiae* on mitokondriaalse genoomi uurimiseks väga hea mudelorganismi. *S. cerevisiae* tuumagenoom kodeerib nelja DEXH/D perekonna helikaasi, mis osalevad mtDNA ja mitokondri terviklikkuse säilimises (Mss116, Suv3, Mrh4, Irc3).

Helikaasid moodustavad ensüümide klassi, mis katalüüsivad kaheaheelaliste energiaallikalt stabiilsete nukleotiidide lahti harutamist üheaheelalisteks nukleotiidideks, kasutades selleks nukleosiidi 5'-trifosfaatide (NTP) hüdrolyüüsi vabanevat energiat. Helikaasid osalevad peaaegu kõigis nukleotiidide metabolismiga seotud protsessides ja kuuluvad sageli makromolekulidest koosnevatesse kompleksidesse. Kõikidele helikaasidele on omased kaks Rec-A-laadset helikaasi domeeni. Lisaks sellele on enamus helikaasidel omased lisadomeenid, mis võivad osaleda spetsiifiliste nukleotiidide sidumises, allosterilises kontrollis, interaktsioonis teiste valkudega ja oligomeriseerumises.

S. cerevisiae tuumagenoomi kodeeritud mitokondriaalse transpordisignaali Irc3 valk kuulub superperekond II helikaaside hulka ning on oluline pagaripärmi mitokondriaalse DNA metabolismis. Irc3 valgu deleteerimine tekivad iseloomulikud katked mitokondriaalsses DNA-sse, mis põhjustab mitokondriaalse DNA kadumise ja aeroobse hingamisvõime puudulikkusega.

Irc3 helikaasil on omapärane C-terminaalne domeen, mille struktuur ja funktsioon on teadmata. Antud töö eesmärgiks on kloneerida Irc3 valgu C-terminaalseid mutante kodeerivad ekspressioonivektorid ning puhastada Irc3 valgu mutandid ning teostada nende biokeemilise aktiivsuse analüüs, et saada paremaid teadmisi Irc3 domeenide funktsioonidest.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Helikaasid

Esimene prokarüootne helikaas avastati 1976. aastal *Escherichia coli*'st (Abdel-Monem ja Hoffmann-Berling, 1976a) ning kahe aasta möödudes esimene eukarüootne helikaas *Lilium* perekonna taimedest (Hotta ja Stern, 1978). Praeguseks hetkeks on jõutud järeldusele, et helikaasid on laialt levinud ning konserveerunud väga paljudes organismirühmades - viirustes, prokarüootides, eukarüootides ja arhedes, mis näitab nende olulisust DNA ja RNA metabolismis (Umate jt., 2010; Thömmes ja Hübscher, 1990; Schmid ja Linder, 1992). Tuteja poolt juhitud meeskond avastas 2011. aastal *in silico* analüüsi käigus inimese genoomi uurides 95 eri helikaasi, millest 64 olid RNA helikaasid ning 31 DNA helikaasid (Umate jt., 2011).

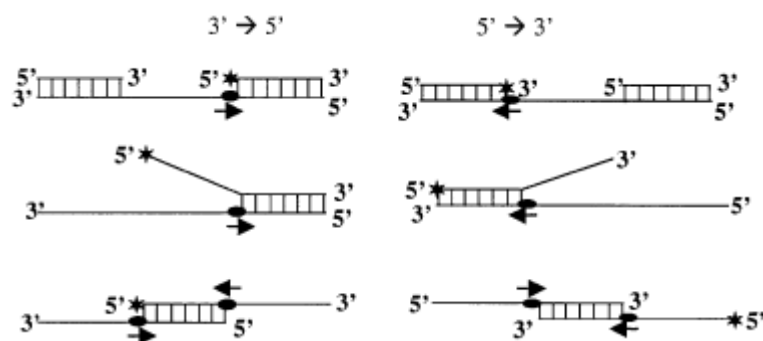
Helikaasid moodustavad ensüümide klassi, mis katalüüsivad kaheaahelaliste energeetiliselt stabiilsete nukleiinhapete lahti harutamist üheaahelalisteks nukleiinhapeteks, kasutades selleks nukleosiid 5'-trifosfaatide (NTP) hüdroolüüsil vabanevat energiat. Nukleiinhapete lahti harutamise käigus katkevad Watson-Crick aluspaaride vahelised vesiniksidemed. Üldiselt kasutavad helikaasid nukleiinhappe ahelate lahti harutamiseks eelistatult ATP hüdroolüüsil vabanevat energiat (Abdel-Monem ja Hoffmann-Berling, 1976a; Geider jt., 1978).

Helikaasid võivad katalüüsida komplementaarsete DNA/DNA, DNA/RNA ning RNA/RNA ahelate lahti harutamist. Võime erinevaid substraate kasutada sõltub spetsiifilisest helikaasist (Abdel-Monem ja Hoffmann-Berling, 1976b; Scheffner jt., 1989).

Hiljaaegu on avastatud, et teatud helikaasid on võimelised üheaahelalisi komplementaarseid nukleiinhappe ahelaid kokku sulatama (ingl *anneal*). Kõik 5 inimeses leiduvat RecQ perekonda kuuluvat helikaasi on ahelaid kokku sulatava aktiivsusega (Wu 2012). Lisaks on mõnel helikaasil ainult NA ahelaid kokku sulatamise aktiivsus (Yusufzai ja Kadonaga 2008).

Üldjoontes on helikaasid spetsiifilise polaarsusega lahtiharutatava nukleiinhappe suhtes ning seonduvad kaksikahelalises nukleiinhappes üheaahelalise piirkonnaga (Joonis 1). Eristatakse 3'-5' ja 5'-3' polaarsusega helikaase. 5'-3' helikaasid eelistavad lahti harutada DNA duplekse, milles on 5' üheaahelaline DNA (ssDNA – *single stranded DNA*) flankeeruv järjestus. See tähendab, et helikaasid liiguvad seondunud ahelal 3' suunas. 3'-5' helikaasid eelistavad vastavalt 3' ssDNA flankeeruvate järjestustega substraate ja liiguvad 5' suunas.

Tihti tõlgendatakse seda kui helikaaside omadust nukleiinhappeid kindlas suunas lahti harutada, kuigi selle kohta ei ole kindlaid tõendeid (Lohman, 1993).



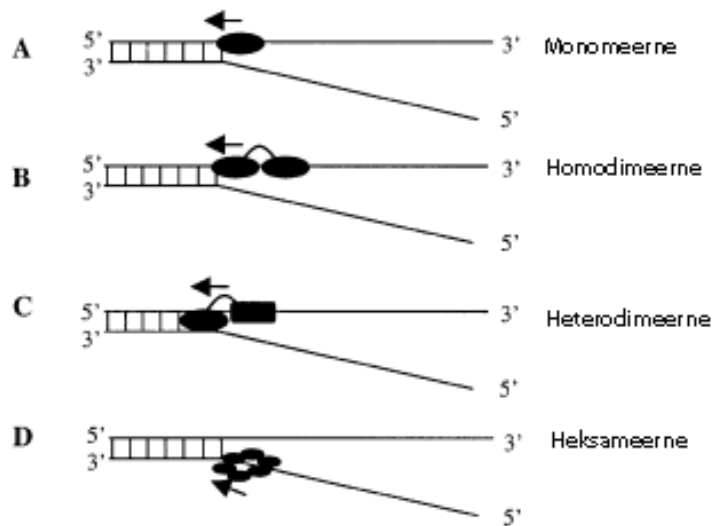
Joonis 1. Tavapäraselt helikaaside polaarsuse määramiseks kasutatavad NA substraadid. Tärn tähistab radioaktiivse ^{32}P -märgistusega NA ahela lõppu. 3'-5' polaarsusega helikaaside substraadid on näidatud vasakul ning 5'-3' polaarsusega helikaaside substraadid on näidatud paremal (Tuteja ja Tuteja, 2014a järgi).

Kuigi paljude helikaaside puhul on üheaahelaline nukleiinhappe piirkond kaheaahelalises nukleiinhappes dupleksi lahti harutamise initsiatsioonikompleksi moodustumise punktiks, leidub helikaase, mida pikem ssDNA inhibeerib ja helikaas seondub tõmbi kaheaahelalise nukleiinhappe otsaga initsiatsioonikompleksi moodustamiseks (Taylor, 1985).

Osade helikaaside nukleiinhappe lahti harutamise aktiivsus on stimuleeritud n-õ hargnenud nukleiinhappe (NA) vormide poolt, kus esineb nii 3' kui ka 5' flankeeruv üheaahelaline nukleiinhape (ssNA) (Matson jt., 1983; Lebowitz ja McMacken, 1986). Lisaks sellele on mõned helikaasid mõlemasuunalise NA ahelaid lahti harutava aktiivsusega (Tanaka ja Schwer, 2006; Tuteja jt., 2014)

Struktuuri alusel võib jagada helikaasid ringi moodustavateks ehk DnaB sarnasteks heksameerseteks ning ringi mitte moodustavateks ehk monomeerseteks (Velankar jt., 1999; Singleton jt., 2000).

Helikaasidel on mitmeid oligomerisatsiooni olekuid (Joonis 2). Eristatakse helikaase, mis on aktiivsed monomeerses, dimeerses ning heksameerses olekus. Dimeersed helikaasid jagunevad omakorda hetero- ja homodimeerseteks (Lohman, 1993).



Joonis 2. Monomeerste ja oligomeerseite helikaaside interaktsioon DNA hargnenud struktuuriga. (A) Monomeerne helikaas seob nii ssDNA-d kui ka dsDNA-d. (B) Homodimeersete helikaaside üks alaühik seob ssDNA-d, mida mööda ta liigub. (C) Heterodimeerne helikaas sisaldab kahte eraldi domeeni: üks alaühik interakteerub dsDNA-ga ning ankurdata helikaasi DNA struktuuri külge ja teine alaühik interakteerub samaaegselt ssDNA-ga ning translokeerub mööda seda. (D) Heksameersed või oligomeersed helikaasid on ringilaadse struktuuriga, mis võimaldab helikaasidel piirata DNA tervenisti ringi ning vältida seeläbi lokaalset ahelate kokku sulandumist. Sellisel juhul seob üks või mitu alaühikut ssDNA-d ssDNA/dsDNA ühinemiskohas (Tuteja ja Tuteja, 2004a järgi).

Helikaaside töömudelitena eristatakse aktiivset ja passiivset vormi. Passiivselt käituvad helikaasid seonduvad katalüüsita termilisest fluktuatsioonist tingituna lahti keerdunud NA ahelatele (Lionnet jt., 2007). Aktiivse mehhanismi järgi talitlevad helikaasid eraldavad ahelaid katalüüsides, milleks kasutatakse ATP hüdrolüüsil vabanevast energiat (Singleton jt., 2000). T4 bakteriofaagi gp41 ja bakteriofaag T7 gp4 on väga sarnase struktuuriga helikaasid, kuid kasutavad erinevaid töömehhanisme NA ahelate lahti harutamiseks, mis muudab helikaaside töömudeli ennustamise ning tõlgendamise keeruliseks (Xie, 2016). Aktiivselt käituvate helikaaside NA lahti harutamise ja mööda NA translokeerumise kiirused on peaaegu võrdsed, kuid passiivsetel helikaasidel on ahelate lahti harutamise kiirus oluliselt väiksem, kui translokeerumise kiirus (Manosas jt., 2010).

Helikaase võib ülalpool välja toodud omaduste põhjal mitmel moel klassifitseerida ja rühmadesse jagada, kuid levinud on jaotus aminohappelise järjestuse alusel.

Helikaaside aminohappelises primaarjärjestuses esinevad konserveerunud aminohappelise järjestusega motiivid, mille arvu ja konsensusjärjestuse alusel jaotatakse helikaasid superperekondadesse (SF) ning perekondadesse. Gorbalenya ja Koonin klassifitseerisid 1993.

aastal helikaasid aminohappelise primaarjärjestuse alusel 3 SF ning 2 perekonda. Sel ajal arvati, et kaks suurimat superperekonda, SF 1 ja SF 2, jagavad 7 ühist aminohappelist motiivi. (Gorbalenya ja Koonin, 1993).

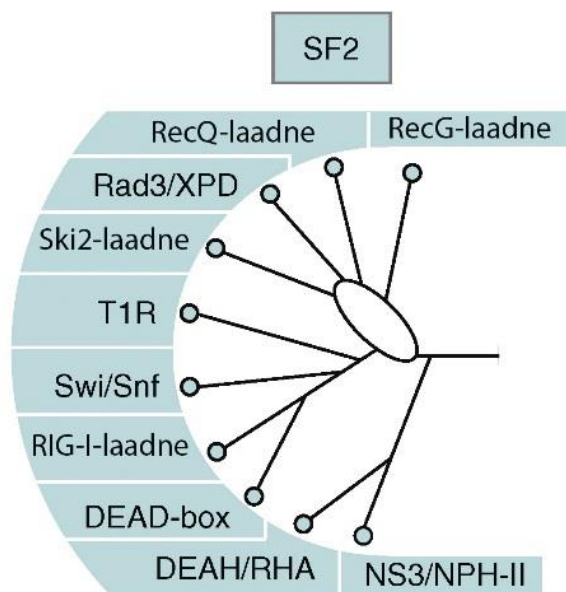
Praegusel hetkel eristatakse 6 SF helikaase, mis jagunevad omakorda perekondadeks. Lisaks on avastatud, et 7 varem nimetatud motiivist ei ole kõik SF1 ja SF2 vahel võrreldavad. (Singleton jt., 2007).

Kuigi aminohappeline primaarjärjestus lubab teha ennustusi ensüümide helikaasse iseloomu kohta, siis ei tähenda helikaasidele omaste motiivide esinemine koheselt, et valgud on võimelised nukleiinhappeid helikaasidele omaselt lahti harutama. On selgunud, et paljud oletatavad helikaasid on valgud, mis hüdrolüüsivad NTP-e ning kasutavad saadud energiat kindlasuunaliseks mööda NA liikumiseks ehk translokeerumiseks (Singleton jt., 2007). Helikaaside perekondades leidub valke, nt Swi/Snf (Zhang jt., 2006), Rig-I (Myong jt., 2009), EcoR124I (Seidel jt., 2008), millel on mööda NA translokeerumise võimekus, kuid puudub NA lahti harutav aktiivsus. Sellised valgud on tähtsad horisontaalsel geeniülekanal bakterites (EcoR124I), kaasasündinud immuunvastuse käivitamisel inimeses (RIG-I) ning nukleosoomide remodelleerimisel (Zhang jt., 2006; Murray, 2000; Kassabov jt., 2003). Samuti leidub translokeerumise võimeta helikaase, mis võivad NA lahti harutada, nt Ded1 (Yang jt., 2006; Yang jt., 2007).

Antud bakalaureuse töös uuritav rekombinatiivne helikaas Irc3 kuulub aminohappelise primaarjärjestuse alusel SF II helikaaside hulka (Sedman jt., 2014).

1.1.1 Superperekond II helikaasid

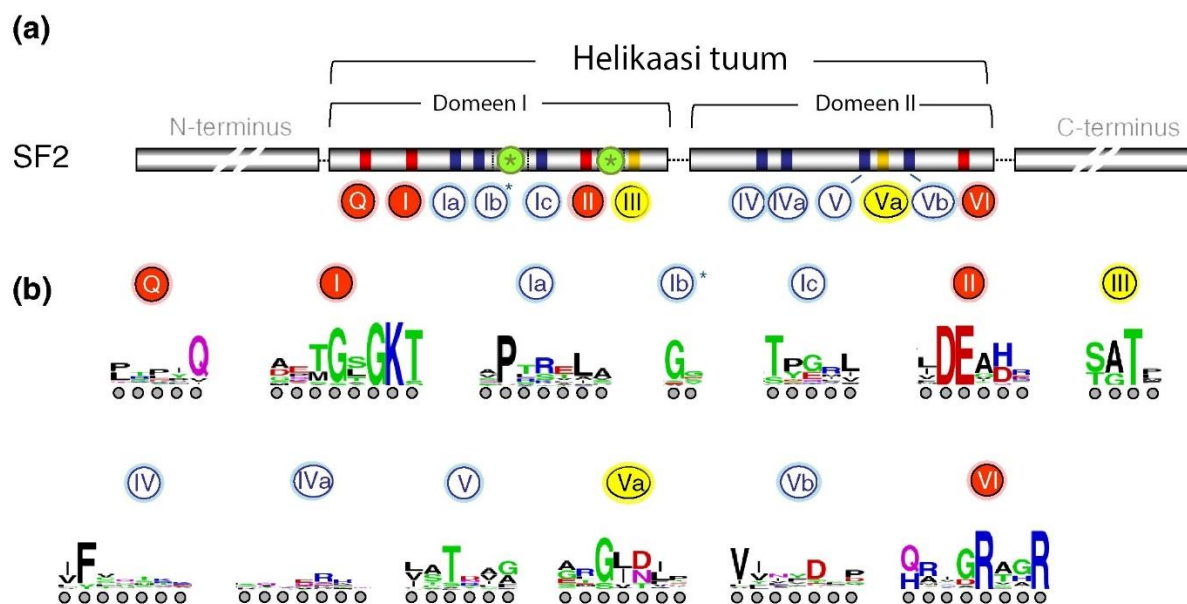
Superperekond kaks on kõige suurem helikaaside superperekond, kuhu kuulub 10 perekonda: RecG-laadne, RecQ-laadne, Rad3/XPD, Ski2-laadne, Tüüp I restriksiooni ensüümid (T1R), Swi/Snf, RIG-I-laadne, DEAD-box, DEAH/RHA, NS3/NPH-II (Joonis 3). Antud töös kasutatud perekondade tähistus pärineb Jankowsky labori poolt teostatud helikaaside aminohappelise järjestuse alusel tehtud fülogeneetilisel analüüsil. Perekond tähistab mainitud töö kohaselt ühest organismist leitud vähemalt kolme helikaasi, mis moodustasid klatri aminohappelisel järjestusel põhineval fülogeneetilisel analüüsil. Mõned SF II helikaasid ei kuulu ühetähenduslikult kuskile perekonda ning moodustavad eraldiseisvaid grappe. (Singleton jt., 2007; Fairman-Williams jt., 2010; Byrd ja Raney, 2013).



Joonis 3. Superperekonda II kuuluvad perekonnad. Skemaatiline juurimata kladogramm näitab SF II kuuluvaid perekondi. Harude pikkused ei ole võrreldavad ning ovaal tähistab ebamäärasusest kladogrammi selles piirkonnas. Perekonnad on nimetatud käibel olevate nimetuste alusel või prominentsete liikmete järgi. T1R – *type 1 restriction enzymes*; RHA – *RNA helicase A* (Fairman-Williams jt., 2010 järgi).

Superperekonda II iseloomustab 200-700 aminohappe pikkune helikaasi tuum (ingl *core*), mis koosneb kahest omavahel väga sarnasest konserveerunud helikaasi domeenist, mis mõlemad meenutavad RecA valku (Gorbalenya ja Koonin, 1993; Singleton jt., 2007). Sellest tulenevalt nimetakse neid domeene ka RecA-laadseteks domeenideks. Kaks RecA-laadset domeeni on ühendatud peptiidse lingu poolt ja nende kahe domeeni vahele on kokku pakituna moodustunud pilu, mis on katalüütilise tähtsusega (Subramanya jt., 1996).

SF II helikaaside tuumale on omased vähemalt 12 motiivi: Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III, IV, IVa, V, Va, Vb ja VI (Joonis 4). Ib motiiv võib olla mõnedel helikaasidel lisadomeeniga asendunud (Fairman-Williams jt., 2010). Kõik need motiivid ei ole SF II helikaaside perekondades konserveerunud (Gorbalenya ja Koonin, 1993). Igale perekonnale on omane kõrgelt konserveerunud motiivide muster (Fairman-Williams jt., 2010).



Joonis 4. Superperekonnas II leiduvad motiivid. (a) Superperekond II helikaaside tuumas paiknevate motiivide paigutus. Motiivid on märgitud kindlate värvidega ning tähistavad neile omast üldist biokeemilist funktsiooni. Punasega märgitud motiivid osalevad ATP sidumisel ja hüdrolüüsimisel, kollasega märgitud motiivid nukleiinhappe ja NTP sidumissaitide koordinatsioonis ning sinisega märgitud motiivid nukleiinhappe sidumisel. Rohelised tärnid tähistavad lisadomeenide insertsioonisaite. (b) Helikaasi motiivide konserveerumine. Tähe kõrgus motiivi järjestuses näitab aminohappejäägi konserveerumise taset - mida kõrgem täht, seda konserveerunud aminohape. Tähtede värv tähistab aminohappe keemilisi omadusi: roheline ja lilla – polaarne, sinine – aluseline, punane – happeline ja must tähistab hüdfoobset aminohapet. Motiivid IVa võivad olla tähistatud ka kui QxxR ning Ic kui TPG (Fairman-Williams jt., 2010 järgi)

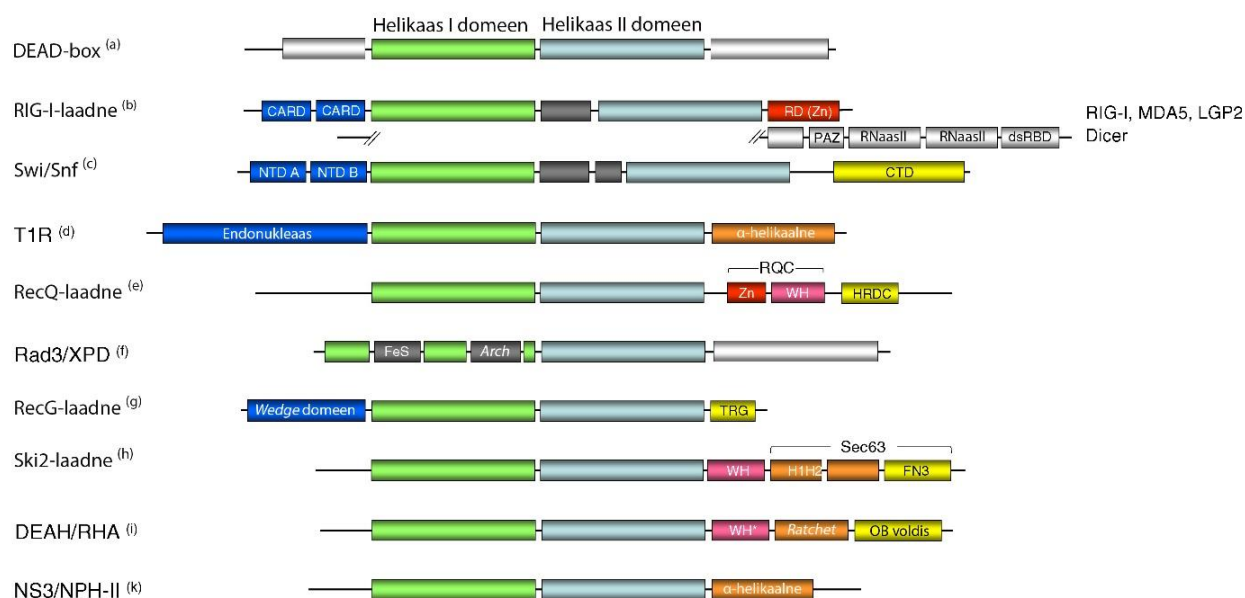
Motiivid Q, I, II, VI on seotud ATP sidumise ja hüdrolüüsimisega (Joonis 4). Motiivid Ia, Ib, Ic, IV ja IVa, V, Vb on kontaktis nukleiinhappega. Motiivid III ja Va koordineerivad arvatavasti ATP ja DNA seondumist (Singleton jt., 2007; Fairman-Williams jt., 2010)

Praeguste teadmiste juures tundub, et SF II helikaasid töötavad üldiselt monomeerses või dimeerses olekus (Singleton jt., 2007). Samas on tuvastatud, et SF II helikaasid võivad olla ka kõrgemalt oligomeriseerunud vormides kaksikahelaliste NA-te lahti harutamise keerulisemate protsesside puhul. Nt RecQ1 puhul on leitud, et tetrameerses vormis võib RecQ1 lahendada Holliday ühendusi ja WNR võib heksameerses vormis NA ahelaid kokku sulatada (Singleton jt., 2007; Muftuoglu jt., 2008; Lucic jt., 2011).

1.1.2 Superperekonnas II leiduvad lisadomeenid

Gorbalenya ja Koonini poolt teostatud helikaaside aminohappelistes järjestustes analüüsil selgus, et kuigi helikaaside superperekondades ja perekondades on aminohappelised motiivid kõrgelt konserveerunud, siis neid ümbritsev piirkond on aminohappelise järjestuse poolest väga varieeruv ning sõltuv konkreetsest helikaasist (Gorbalenya ja Koonin, 1993).

Helikaasiks aktiivsuseks vajalik minimaalne helikaasi struktuur koosneb *per se* kahest konserveerunud RecA-laadsest domeenist (Subramanya jt., 1996). Peaaegu kõigil SF II helikaasidel on RecA-laadsetele domeenidele lisaks täiendavad domeenid (Joonis 5), mis paiknevad tuumaga külgnevalt N- ja C-terminaalselt või insertioonidena tuumas (Singleton jt., 2007).



Joonis 5. Superperekond II perekondades leiduvad lisadomeenid. Joonisel on kujutatud SF II perekondade tüüpesindajad ning neile omased domeenid. Perekondadele omased insertioonid on tähistatud hallilt. (a) DEAD-box perekond. (b) RIG-I-laadne perekond. (c) Swi/Snf perekonna tüüpesindaja bakteriaalse RapA valgu domeenide organisatsioon. (d) T1R perekonna tüüpesindaja EcoR124I domeenide organisatsioon. (e) RecQ-laadne perekond. (f) Rad3/XPD valkude perekond. (g) RecG-laadsete valkude domeenide organisatsioon on suuresti konserveerunud, kuid PriA valgul on perekonnaga võrreldes ebatüüpiline Zn-sõrm insertioon helikaas II domeenis. (h) Ski2-laadne perekonna tüüpesindaja Hel 308 domeenide organisatsioon. (i) DEAH/RHA valkudel on C-terminus väga konserveerunud. (k) NS3/NPH-II valkudel on tunnustatud C- ja N-terminaalsed domeenid, kuid *Flaviridae* NS3 valkudel on erandlik C-terminus (Fairman-Williams, 2010 järgi).

SF II helikaaside C- ja N-terminused on väga varieeruvad nii pikkuselt, struktuurilt, biokeemilise aktiivsuse, kui ka aminohappelise järjestuse poolest (Tuteja ja Tuteja., 2004b) ja

on sageli oma mõõtmetelt suuremad, kui helikaasi tuum (Fairman-Williams jt., 2010). Näiteks helikaas Diceri lisadomeen moodustab Diceri aminohappelisest järjestusest ~1:3 (Bernstein jt., 2001).

Lisadomeenid annavad helikaasidele spetsiifilise ja tihtilugu täiendava katalüütilise aktiivsuse (Joonis 5). Täiendav katalüütiline aktiivsus ning spetsiifilisus võib tuleneda helikaasile omasest domeenist või mõnelt teiselt valgult, millega helikaasi lisadomeen interakteerub. Sellest sõltuvalt kuuluvad helikaasid sageli makromolekulidest koosnevatesse kompleksidesse (Singleton jt., 2007). Helikaaside C- ja N-terminused on perekonnasiseselt enamjaolt samuti varieeruvad, mis seletab lisadomeenide olulisust ka füsioloogilise spetsiifilisuse saavutamiseks (Fairman-Williams jt., 2010).

Suurel hulgal määratud struktuuriga SF II helikaasides esineb vähemalt üks NA-d tuvastav lisadomeen (Bhattacharyya ja KeckBohr, 2014). Nukleiinhapetega interakteeruvad lisadomeenid varieeruvad oma funktsiooni ja substraadispetsiifilisuse poolest. Erinevate helikaaside struktuure uurides on leitud RNA tuvastus motiiv (*RRM – RNA recognition motif*), mis seondub spetsiifiliselt 23S rRNA juuksenõela moodustava järjestustega (Wang jt., 2006), RNA-d kokku voltivad *wedge* domeenid, mis eraldavad komplementaarsed RNA ahelad teineteisest (Del Campo ja Lambowitz, 2009), viraalse 5'fosfaats lõpuga RNA-ga seonduv domeen (Cui jt., 2008), 3' üleulatuvate otsadega dsRNA-d seondav domeen (MacRae jt., 2006), tõmbiotsalist dsDNA-d seondav domeen (Kitano jt., 2010), hargnenud DNA struktuure ja HJ-t siduvad domeenid (Kitano jt., 2010; Büttner jt., 2007; Briggs, 2005; von Kobbe jt., 2003), replikatsioonikahvlites 3'OH DNA-liiderahelaga seonduv domeen (Mizukoshi jt., 2003) DNA kahjustuste tuvastamisel osalev Fe-S klastritest moodustunud domeen, mis seob ssDNA-d (Fan, 2008), *G-quadruplex*'it siduv domeen (Huber jt., 2006) ning teisi NA ahelatega seonduvaid domeene (Bhattacharyya ja KeckBohr, 2014).

Lisadomeenide hulgas leidub ka oligomeriseerumises osalevaid domeene. Nt DEAD-box helikaasi Hera C-terminaalne domeen viib läbi ligandidest sõltumatult Hera dimerisatsiooni (Klostermeier ja Rudolph, 2009). Samas on ka leitud ligandidest ja kofaktoritest sõltuvaid domeene, mis osalevad helikaaside oligomeriseerumises, nt helikaas RecQ1 helikaasi N-terminaalne piirkond osaleb ligandidest sõltuvas oligomeriseerumises (Joonis 5 (e)). Katsetest on selgunud, et RecQ1 kõrgemad oligomerisatsiooni astmed on stimuleeritud ssDNA poolt ning inhibeeritud ATP ja ATP analoogide poolt. Kõrgemates oligomerisatsiooni vormides on RecQ1 NA kokku sulatava, kuid monomeerses ja dimeerses vormis lahti harutava aktiivsusega (Muzzolini jt., 2007; Popuri jt., 2008; Lucic jt., 2011). Seega võib käsitleda

RecQ1 oligomeriseerumises osalevat N-terminust ka kui allosteerilises regulatsioonis osalevat domeeni.

SF II helikaaside domeenide hulgas leidub ka teisi allosteerilises kontrollis osalevaid domeene (Kakar jt., 2015). Flaviviridae viiruste sugukonna helikaasid, nende hulgas kas HCV helikaas NS3, eristuvad oma C-terminuses paikneva domeeni poolest, mis koordineerib arvatavasti proteaasile domeenile omase substraadi seondumist ning osaleb proteaasse ja helikaasse domeeni allosteerilises kontrollis (Joonis 5 (k); Kim jt., 1998; Fairman-Williams jt., 2010; Stross jt., 2016).

Teiste valkudega interakteeruvad lisadomeenid on väga olulisel kohal oma rolli ja rohkuse poolest. Regulaatorsete valkude või makromolekulidest moodustunud komplekside alaühikutega interakteeruvad helikaasi lisadomeenid kontrollivad tihti helikaasi aktiivsust ning kaasavad helikaasi suuremasse kompleksi, andes seal helikaasile spetsiifilise funktsiooni (Xiol jt., 2014; Cui jt., 2008; Shaw jt., 2008; Kakar jt., 2015; Coin, 1998; Walbott jt., 2010).

Ski2-laadsele helikaasile Mtr4 omane Arch domeen, mis paikneb Sec63 domeenis, on vajalik korrektseks TRAMP vahendatud (5.8S) rRNA protsessimiseks (Joonis 5 (h); Jackson jt., 2010) Mtr4 Arch domeen seondub TRAMP kompleksi kuuluva Air2p alaühikuga ning on vajalik TRAMP kompleksi vahendatud eksosoomi lagundamise aktiveerimiseks (Holub jt., 2012).

Valkudega interakteeruvad lisadomeenid võivad hõlbustada lisaks kontakte nukleiinhapetega. Swi/Snf perekonna C-terminusele on omane bromodomeen (*bromodomain*), mis võib interakteeruda histooni sabades atsetüleeritud lüsiini aminohappejääkidega, lähendades seega katalüütiliselt aktiivset helikaasi piirkonda substraadile (Joonis 5 (c); Mohrmann ja Verrijzer, 2005; Dürr jt., 2005;).

RIG-I-laadse perekonna põhiesindaja, multidomeenne Rig-I helikaas, mis osaleb inimeses viirusliku RNA tuvastamisel ja kaasasündinud immuunvastuse käivitamisel, näitlikustab hästi lisadomeenide olulisust helikaaside spetsiifilistes füsioloogilistes funktsioonides (Leitão jt., 2015). Rig-I helikaasi N-terminuses paiknevad kaspaasi aktiveerivad domeenid (*CARD - caspase activation and recruitment domain*), mis osalevad interferoonide tootmiseni viivas signaaliülekanandes, kui CARD domeen seondub kaspaasiga. C-terminuses paikneb reguleeriv domeen (RD – *regulatory domain*), mis seondub viraalse 5' trifosfaatses lõpuga RNA-ga ning toob kaasa helikaasi konformatsiooni muutuse, mis viib signaaliülekanzeni (Joonis 5 (b); Fujita jt., 2007; Cui jt., 2008; Leitão jt., 2015).

SF II helikaaside lisadomeenidest mõned annavad helikaasidele ensümaatilise lisaaktiivsuse. Nt RIG-I-laadsele helikaasile Dicerile on omane C-terminaalselt kahes korduses esinev RNAas III domeen, mis annab Dicer helikaasile endoribonukleaasse aktiivsuse (Joonis 5 (b); Bernstein jt., 2001; MacRae jt., 2006). Samuti leidub T1R perekonna esindajal EcoR124I-I N-terminuses endonukleaasse aktiivsusega domeen (Joonis 5 (d)), mis annab EcoR124I helikaasile restriksioonivõime (Lapkouski jt., 2009) ning RecQ-laadsesse perekonda kuuluva helikaasi WRN N-terminuses paikneval domeenil eksonukleasne aktiivsus (Huang jt., 1988; Perry jt., 2006). NS3/NPH-II perekonna helikaasidel leidub seevastu N-terminaalses osas proteaasse aktiivsusega domeen, mis on vajalik viiruse genoomi replikatsiooniks (Markland jt., 1997; Vlackhakis jt., 2013, Fairman-Williams jt., 2010).

Lisaks eelpool nimetatutele on helikaaside korrektseks funktsioneerimiseks väga olulised ka helikaaside rakusiseses lokalisatsioonis osalevad domeenid ja aminohappelised järjestused (Upton jt., 2014; Sedman jt., 2014; Vindigni ja Hickson, 2009). Helikaaside struktuuri säilitamiseks on vajalikud domeene ühendavad vahelülid ja domeenid, mis kannavad üle ATP hüdrolyüsil vabaneva energia translokeerumiseks (Fan jt., 2008; Pena jt., 2009; Pike jt., 2008; Vindigni ja Hickson 2009).

1.1.3 Helikaaside funktsioonid organismides

Helikaasid osalevad pea kõigis nukleiinhapetega seotud metabolismiprotsessides ja on seega väga olulised geenide avaldumisel (Delagoutte ja von Hippel, 2003).

Helikaasid osalevad replikatsioonis, harutades lahti dsDNA-d (Lebowitz ja McMacken, 1986), transkriptsiooni regulatsioonis, seondades transkriptsioonifaktoreid transkriptsiooni initsiatsioonikompleksiga või stabiliseerides transkriptsiooni initsiatsioonikompleksi (Fuller-Pace, 2006), konstitutiivses ja alternatiivses pre-mRNA spaissimises (Staley ja Guthrie, 1998; Hönig jt., 2002; Holub jt., 2012), ribosoomide biogeneesis (Leeds jt., 2006; Bohnsack jt., 2009) ning translatsiooni initsiatsioonis (Grifo jt., 1984; Iost jt., 1999; Linder, 2003).

Helikaasid on tähtsal kohal ka genoomi stabiilsuse tagamisel. Helikaasid osalevad rekombinatsiooniprotsessides, DNA mutatsioonide parandamises, peatunud replikatsiooni taaskäivitamises ja telomeeride korrashoius (McGlynn ja Lloyd, 2002; Bohr jt., 2008; Wu jt., 2009).

Helikaasid osalevad RNA-de ja pre-ribosomaalsete alaühikute transpordis tuumast tsütoplasmasse (Gatfield jt., 2001; Neumann jt., 2016).

Helikaasid kuuluvad erinevatesse eksosoomidesse ning osalevad seeläbi RNA lagundamises (de la Cruz jt., 1998; Dziembowski jt., 2003). Lisaks eksosoomidesse kuulumise on helikaasidel ka keskne koht RNA interferentsil (MacRae jt., 2006) ning kaasasündinud viirusvastase immuunvastuse käivitamisel (Fujita jt., 2007; Cui jt., 2008; Leitão jt., 2015). Samuti osalevad helikaasid piRNA-de biogeneesis ja geenide transkriptsioonijärgses vaigistamises (Xiol jt., 2014).

Helikaasid osalevad ka ödekromatiidide kohesioonis, raku signalisatsioonis, rakutsükli reguleerimises ja kromatiini remodelleerimisel (Wu jt., 2009; Clapier ja Cairns, 2009; Kasten jt., 2011)

Flaviviridae sugukonna viirustes esinev NS3 helikaas osaleb lisaks viiruse genoomi replikatsioonile ka virionide kokku pakkimises (Kümmerer ja Rice, 2002; Liu jt., 2002; Vlackhakis jt., 2013)

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* ja selle mtDNA

Saccharomyces cerevisiae ehk pagaripärm on laialdaselt kasutatud mudelorganismina erinevate rakuliste protsesside uurimisel. *Saccharomyces cerevisiae* paljud regulatoorsed, metaboolsed ja biokeemilised rajad on konserveerunud ka kõrgemates eukarüootides, mis muudab pagaripärmi väga heaks uurimisobjektiks rakubioloogia, metabolismi, rakutsükli ning signaaliradade uurimisel (Usaita jt., 2009; Zhang jt., 2010; Petranovic jt., 2010). Pagaripärmi on võimalik kiiresti, odavalt ja suurtes kogustes kultiveerida ning uurida nii haploidseid, kui ka diploidseid eluvorme (Petranovic jt., 2010).

Mitokondrid on kahemembraansed pooleldi iseseisvad rakuorganellid, mida leidub peaaegu kõigis eukarüootides (Henze ja Martin, 2003). Lisaks sellele, et mitokondritel on keskne koht aeroobses hingamises ja oksüdatiivses fosforüleerimises, osalevad mitokondrid rakkude signalisatsioonis, aminohapete, lipiidide ja raua metabolismis, rakkude diferentseerumises, rakkude surma, rakkude kasvamise ja rakutsükli kontrollis (Newmeyer ja Ferguson-Miller, 2003; McBride jt., 2006). Mitokondri eriliseks tunnuseks on tuumast eraldiseisev genoom.

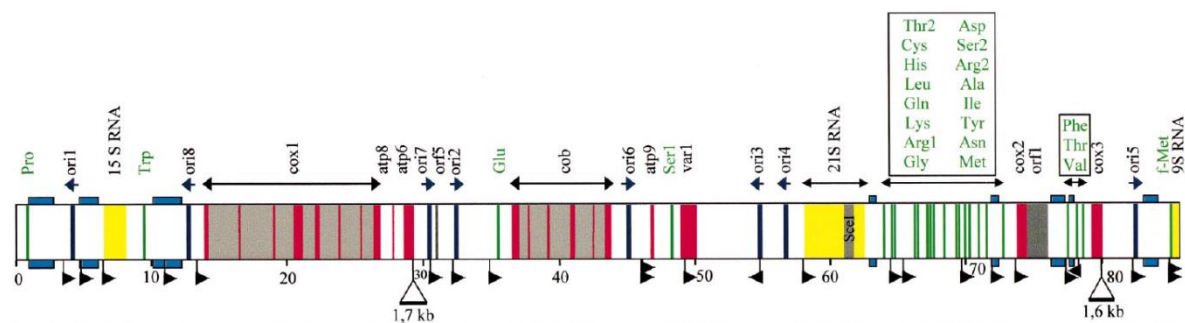
Saccharomyces cerevisiae on metabolismitüübi poolest fakultatiivne anaeroob ning suudab kasvada fermenteeritaval ja mittefermenteeritaval süsinikuallikal. *Saccharomyces cerevisiae*

suudab fermentatiivsel söötmel kasvades toime tulla mitokondriaalse DNA (mtDNA) deletsioonide ja kaotusega, see muudab *Saccharomyces cerevisiae* väga heaks mudelorganismiks mitokondri funktsioonide uurimisel (Ephrussi jt., 1955). Defektid mitokondrites, mtDNA osaline või täielik kadumine põhjustab aeroobse hingamisvõimekuse puudulikkuse või kaotuse (Williamson, 2002).

Pagaripärmi mitokondriaalne genoom on tuntud ka kui *rho* faktor ja seda tähistatakse kreekakeelse tähega ρ . Metsiktüüpi pärmirakud, mis hingavad normaalselt ja moodustavad suuri kolooniaid on tähistatud kui ρ^+ . *Petite* (pr. keeles väike) mutandid on võimetud aeroobselt hingama, kuid võivad fermenteeritavatel süsinikuallikatel kasvada ja moodustada iseloomulikke väikeseid kolooniaid. *Petite* mutantide mtDNA on täielikult deleteerunud (ρ^0) või koosneb tervikliku genoomi fragmenteerumisel tekkinud fragmentidest (ρ^-). Selline tähistus on levinud aeroobse hingamisvõimekuse ja mtDNA terviklikkuse kirjeldamiseks (Williamson, 2002).

Saccharomyces cerevisiae mitokondrile on omane eraldiseisev nukleoididesse pakitud enamjaolt lineaarne genoom ja väiksemal määral tsirkulaarne genoom (Maleszka jt., 1991; Chen ja Butow, 2005). *S. cerevisiae* mitokondriaalne genoom on 75 kb pikk ja replitseerub tõenäoliselt veereva ratta mehhanismil (Maleszka jt., 1991; Chen ja Butow, 2005). Mitokondriaalne genoom (Joonis 6) kodeerib elektrontransportahelasse kuuluvaid elemente, rRNA-sid ja tRNA-sid (de Zamaroczy jt., 1986; Tzagoloff ja Myers, 1986). Sellest tulenevalt on mtDNA terviklik säilimine väga oluline respiratoorsete funktsioonide säilimiseks (Chen ja Butow, 2005).

Mitokondriaalse DNA tervikliku säilimise jaoks on lisaks mitokondriaalse genoomi poolt kodeeritud produktidele vajalikud tuuma genoomilt kodeeritavad valgud, mis lokaliseeruvad mitokondrisse ning integreeruvad sealsete membraanidega, mõne füsioloogiliselt olulise kompleksiga või osalevad mitokondri reparatsiooniprotsessides (Smeitink jt., 2001; Chen ja Butow, 2005; Becker jt., 2009; Schmidt jt., 2010; Sanchez-Sandoval jt., 2015). Mitokondriga arvatakse seotud olevat ~1000 valku ja mitokondri enda poolt kodeeritud valgud moodustavad nendest ~1% (Schmidt jt., 2010). Tuuma genoomi poolt kodeeritud valgud on absoluutselt vajalikud mitokondri funktsioonide toimimiseks (Chen ja Butow, 2005; Schmidt jt., 2010).



Joonis 6. *Saccharomyces cerevisiae* FY1679 tüve lineariseeritud mitokondriaalse genoomi kaart. Punasega on märgitud eksonid ja valke kodeerivad geenid; halliga intronid või intronitega seotud lugemisraamid; rohelisega tRNA-d kodeerivad geenid; kollasega 9S, 15S ja 21S rRNA sünteesis osalevad geenid; tumesiniselt ori piirkonnad; lippudega on märgitud transkriptsiooni intsiatsiooni saidid ja nende orientatsioon; suured kolmnurgad tähistavad deletsioone (Foury, 1998).

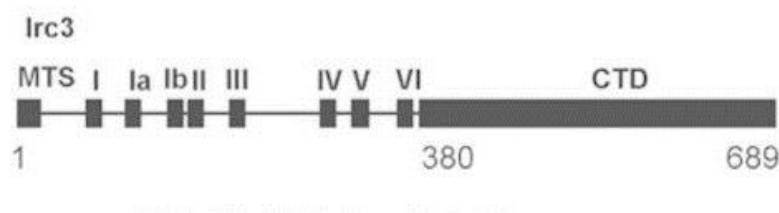
Saccharomyces cerevisiae tuumagenoom kodeerib nelja DExH/D perekonna helikaasi, mis osalevad mtDNA ja mitokondri terviklikkuse säilimises (MSS116, SUV3, MRH4, IRC3) (Szczesny jt., 2013).

1.3 Irc3

Irc3 valk avastati 2007. aastal tuuma Rad52-YFP (*yellow fluorescent protein*) fookuste arvu muutusi põhjustavate geenideletsioonide tuvastamiseks läbi viidud uuringu käigus (Alvaro jt., 2007). Rad52 on hea homoloogilise rekombinatsiooni marker lokaliseerudes dsDNA katkete, ssDNA ja peatunud replikatsioonikahvlite piirkonda (Haaf jt., 1999; Raderschall jt., 1999; Lisby jt., 2003). Homoloogiline rekombinatsioon viiakse läbi Rad52 seotud valkude grupi poolt, kus Rad52 on olulise tähtsusega homoloogilise rekombinatsiooni jaoks vajaliku valkudekompleksi moodustumisel (Lisby ja Rothstein, 2005; Alvaro jt., 2007). Eelpool mainitud uuringu käigus avastati 86 Rad52 fookuste arvu mõjutavat geeni, millest 22 olid varem teadmata Rad52 fookuste arvu mõjutavat avatud lugemisraami *IRC2-11, 13-16, 18-25* (*increased recombination centers*) (Alvaro jt., 2007).

Irc3 on kodeeritud YDR332W avatud lugemisraami poolt ning kuulub SF II helikaaside hulka. Irc3 motiiv II on sarnane DEAH perekonnale, kuid üldine aminohappeline järjestus viitab sellele, et Irc3 on DEAD perekonna liige. Irc3 kuulub seega DExH/D perekonda (de la Cruz jt., 1999; Szczesny jt., 2013). Irc3 valgule on omane 28 aminohappe pikkune N-terminaalne mitokondri lokaliseerumise signaal (Joonis 7.), mida on korduvalt kinnitatud

(Huh jt., 2003, Sedman jt., 2014). Lisaks sellele on Irc3 valgule iseloomulik C-terminuses paiknev domeen, mille funktsioon on teadmata (Joonis 7; Sedman jt., 2014).



Joonis 7. Irc3 valgu motiivid ja domeenid. Irc3 N-terminusele on omane mitokondriaalseks transpordiks vajalik signaal (MTS). Irc3 C-terminuse funktsioonid on teadmata (Sedman jt., 2014 järgi).

IRC3 geeni deletsioon fermenteeritaval süsinikuallikal kasvavatel w303 *S.cerevisiae* pärmitüvedel põhjustab kasvu aeglustumist (Shiratori jt., 1999) ning ρ^- fenotüübi teket, $\Delta IRC3$ tüved suudavad aga oma respiratoorset võimet ja funktsionaalset mtDNA-d säilitada, kui nad kasvavad mittefermenteeritaval söötmel (Szczesny jt., 2013; Sedman jt., 2014). *IRC3* deleteerimine põhjustab kaksikahelalisi katkeid ρ^+ mt genoomide teatud regioonides ning mõjutab ρ^- genoomide metabolismi (Sedman jt., 2014).

Irc3 on dsDNA-st sõltuv helikaas, mis on otseselt seotud mtDNA metabolismiga ja kasutab tööks ATP hüdrolüüsil vabanevat energiat (Sedman jt., 2014). Irc3 ei haruta märgatavalt lahti tõmbiotsalisi ega ka 3' ja 5' üleulatuvaid dsDNA substraate (Sedman jt., 2014). Irc3 seondub eelistatult HJ-t ja replikatsioonikahvli meenutavate struktuuridega ning osaleb nende remodelleerimisel, harutades lahti replikatsioonikahvleid meenutavaid struktuure ja osaledes HJ-i harukohtade ümberpaigutamises mööda DNA ahelat (ingl *branch migration*) (Gaidutšik jt., 2016). Mitokondriaalse transpordisignaali bakterialne RecG valk on võimeline komplementeerima Irc3 kaotust, mis viitab sellele, et Irc3 võib täita sarnast rolli bakteriaalsete *branch migration*'is osalevate ensüümidega (Gaidutšik jt., 2016).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

1.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärk oli konstrueerida Irc3 C-terminuse mutante kodeerivad ekspressioonivektorid. Välja puhastada Irc3 valgu N- ja C-terminuse mutandid ja teostada nende biokeemilise aktiivsuse analüüs.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Bakteritüved ja plasmiidid

Bakalaureuse töö raames tehtud katsete läbiviimiseks kasutati kahte *Escherichia coli* bakteritüve.

IRC3 mutantsete ekspressioonivektorite kloonimiseks kasutati kompetentset *E. coli* DH5 α tüve ning rekombinantsete Irc3 mutantide ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* BL21RIL tüve.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved

Bakteritüvi	Genotüüp	Viide allikale
DH5 α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1</i> <i>gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi 80$ <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rKmK+), λ -	<i>Bethesda</i> <i>Research</i> <i>Laboratories,</i> 1986
BL21-CodonPlus-RIL	F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal</i> λ <i>endA Hte</i> (<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r)	<i>Agilent</i>

Tabel 2. Töös kasutatud plasmiidid

Plasmiidid		
pGEX-4T1	IPTG-ga indutseeriva promooteri ja Amp resistentsusgeeniga GST märgisega rekombinantsete valkude ekspresseerimise plasmiid	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
pGEX-4T1 <i>IRC3</i>	<i>Irc3</i> Δ 28 insertiooniga vektorplasmiid	Ilja Gaidutšik
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ G386	<i>IRC3</i> Δ G386 insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ T412	<i>IRC3</i> Δ T412 insertiooniga vektorplasmiid	Juhan Sedman
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ V413	<i>IRC3</i> Δ V413 insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ R435	<i>IRC3</i> Δ R435 insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ S480	<i>IRC3</i> Δ S480 insertiooniga vektorplasmiid	Käesolev töö
pGEX-4T1 Δ 28 <i>IRC3</i> Δ N482	<i>IRC3</i> Δ N482 insertiooniga vektorplasmiid	Juhan Sedman

2.2.2 Söötmed ja kasvutingimused

LB: (*Luria broth*) – 1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,5% agar (Bertani, 1951). Tardsöötmete tegemiseks lisati 1,7% agarit. LB söötmel kasvatud DH5 α ja BL21RIL rakud kasvasid 37 °C juures.

2xYT (*Yeast Extract Tryptone*): 1% pärmiekstrakt, 1,6% trüptoon, 0,5% NaCl (Sambrook ja Russel, 2001). 2xYT söötmel kasvatud DH5 α ja BL21RIL rakud kasvasid 37 °C juures.

M9Ca: 0,5% kasaminohaped, 0,5% Ca, 0,4% glükoos, 2 μ M MgSO₄, 0,1 μ M CaCl₂, 1,28% Na₂HPO₄·7H₂O; 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,01% NH₄Cl (Sambrook ja Russel, 2001).

Selektiivsöötmetele lisati kasutatava bakteri plasmiidis klooramfenikooli (Cam) või ampitsiliini (Amp) resitsentsusgeenide esinemise korral ampitsiliini lõppkontsentratsioonini 100 µg/ml ja klooramfenikooli lõppkontsentratsioonini 50 µg/ml.

2.2.3 PCR reaktsioonid

Töö raames tehtud PCR reaktsioonid viidi läbi *Eppendorf* PCR'i masinas *Mastercycler personal* või *Biometra* PCR'i masinas T1 *Thermocycler*.

Preparatiivsetes PCR'i reaktsioonides kasutati Biokeemia laboris puhastatud Taq või Pfu polümeraase. Reaktsioone korraliti 25 tsükli. PCR programm, mida kasutati, koosnes ühekordsest 95 °C juures 3 min pikkusest eelkuumutusest, mille järel toimus 25 korduses 95°C 30 sek DNA denaturatsioon, 56 °C 30 sek praimerite seondumine, 72 °C 1 min 20 sek DNA süntees.

IRC3 mutantide konstrueerimiseks ja amplifitseerimiseks tehtud 25 µl PCR reaktsioonisegu sisaldas: 1x PCR puhvrit (750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% [TritonX, pH8,8]), 20 µM dNTP, 2,5mM MgCl₂, 0,4 µM praimerit 1, 0,4 µM praimerit 2, 10ng matriitsina kasutatavat plasmidi ning 0,3 U Pfu polümeraasi.

Amplifitseeritud sisend DNA fragmente kontrolliti 0,8% agarosgeelil ning neid kasutati järgnevides töö etappides.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid ja oligonukleotiidid. *Bold-is on tähistatud restriктаaside (GGATCC) BamHI ja (GTCGAC) SalI lõikesaidid.*

Nimi	Järjestus 5'-3'	Eesmärk töös
IRC3F G386-BamHI	ATG GAT CCG GAG CTT CTA GTG TTG GAG TG	Kloneerimine
IRC3F R435-BamHI	ATG GAT CCA GGG CTT TAT TTC AGA CTG ATG	Kloneerimine
IRC3F S480-BamHI	ATG GAT CCA GCA ATA ACT CAT ATC CAT CTG G	Kloneerimine
IRC3F V413-BamHI	ATG GAT CCG TTG AAG ATT TAA AAG CAA TCC AAG	Kloneerimine
IRC3R Stop-SalI	ATA GTC GAC TCA CTT TAT AAA AGA TCT	Kloneerimine

	TCT TTT TTG	
IRC3_3_1097	GTGAACGCGATTTTGTGGGCCTAC	Sekveneerimine
IRC3_FWD_677	GATGACAAGTGGCTATGTGAGGC	Sekveneerimine
pGEX_5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	Sekveneerimine
pGEX_3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Sekveneerimine
Oligo 1 (1114)	TGGGTCAACGTGGGCAAAGATGTCCTAGCAAT GTAATCGTCTATGACGTT	X ₁₂ substraadi valmistamine
Oligo 2 (1115)	GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGCTAGGACATC TTTGCCACGTTGACCC	X ₁₂ substraadi valmistamine
Oligo 3 (1116)	CAACGTCATAGACGATTACATTGCTAGGACAT GCTGTCTAGAGACTATCGA	X ₁₂ substraadi valmistamine
Oligo 4 (1117)	ATCGATAGTCTCTAGACAGCATGTCCTAGCAA GCCAGAATTCGGCAGCGT	X ₁₂ substraadi valmistamine

2.2.4 Agaroosgeelelektroforees (AGE)

DNA eraldamis- ja kloonimistööde raames analüüsiti nukleiinhappeid agaroosgeelelektroforeesil (AGE), mille käigus voolutati 0,8% agaroosgeel (0,8% agaroos, 40mM Tris-atsetaat, 2mM EDTA [pH 8,5], EtBr 0,5 µg/ml) TAE puhvril (40mM Tris-atsetaat, 2mM EDTA [pH 8,5]).

DNA geelile kandmiseks kasutati 6x TAE laadimispuhvit (10 mM Tris-HCl [pH 7,6], 60mM EDTA, 60% glütserool, 0,25% broomfenoolsinine). Suurusmarkerina kasutati Mix5-te (valmistatud Tiina Sedmani poolt). Elektroforees toimus toatemperatuuril (RT – *room temperature*), rakendades agaroosgeelile pinget 2-4 V/cm kohta, kui ei ole kirjeldatud teisiti. AGE käigus lahutatud nukleiinhapped visualiseeriti 260 nm juures *Uvipro Gold*’i kasutades.

2.2.5 Ekspressioonivektorite konstrueerimine

2.2.5.1 Sisend DNA fenooltöötlus

Amplifitseeritud *IRC3* mutantsetele sisend DNA fragmentidele lisati EDTA 7,5 mM lõppkontsentratsioonini, et siduda vabad Mg^{2+} ioonid. Seejärel lisati 20 µg dekstraani DNA sademe visualiseerimiseks ning viidi ruumala kahekordselt destilleeritud veega (ddH₂O) 200 µl-ni ja lisati NaCl 0,1 M lõppkontsentratsioonini ning lisati Phe/CHCl₃ (pH 8~) 1:2 suhtega. Proovile tehti vortex ning hoiti RT-l 10 min. Proov tsentrifuugiti *Eppendorf Mini Spin* tsentrifuugiga (rootor F45 12-11), mida kasutati ka selle töö teistes etappides, 1 min 13400 pööret minutis (rpm – *rotations per minut*). Koguti supernatant, millele lisati NaOAc (pH 7) 0,3 M lõppkontsentratsioonini. Lahusele lisati kolmekordne ruumala 96% EtOH-d ning tehti vortex. DNA sadestati -20 °C 20 min, mille järel tsentrifuugiti lahust 5 min 13400 rpm ja eemaldati supernatant. Sadet pesti 200 µl 80% EtOH-ga kergelt segades ning sadestati DNA-d RT-l 10 min. Seejärel tsentrifuugiti lahust 5 min 13400 rpm, eemaldati supernatant ja lisati DNA-le 20 µl T₁₀E_{0,1} ning säilitati -20 °C juures.

2.2.5.2 Restriksiooni ja ligeerimisreaktsioonid

Ekspressioonivektorite pGEX-4T1 *Δ28 IRC3* (*ΔG386*, *ΔV413*, *ΔR435*, *ΔS480*) loomiseks teostati restriksiooni- ja ligeerimisreaktsioonid, milles kasutati *Thermo Fischer* restriктаase, T4 DNA ligaasi ja puhvreid.

Peatükis 2.2.5.1 kirjeldatult puhastatud sisend DNA ja plasmiid pGEX-4T1 restrikteeriti BamHI ja SalI restriктаasidega. Restriksioonisegu sisaldas 2xY puhvrit, eelnevalt puhastatud sisend DNA-d (20 µl) või plasmidi pGEX-4T1 (1 µg) ning 5U BamHI ja 5U SalI. Reaktsioonisegu ruumala viidi 25 µl-ni ddH₂O-ga.

Restriksioonireaktsioon toimus 37 °C 2-3 h. Reaktsiooni lõppedes lisati reaktsioonisegudele EDTA-d 40 mM lõppkontsentratsioonini ning säilitati -20 °C juures.

Restrikteeritud sisend DNA fragmendid ja pGEX-4T1 plasmiid selekteeriti 0,8% agarosgeelil ning puhastati vastavalt *UltraClean® 15 DNA Purification Kit* (MO BIO Laboratories, Inc) protokollile ja lahustati DNA 30 µl-s T₁₀E₁ puhvris.

Ligeerimisel kasutati T4 ligaasi. Ligeerimiseks kasutatav resktriktsioonisegu maht oli 10 µl ning koosnes 1x T4 ligaasi puhvrist, 0,5 U T4 Ligaasist, 0,1 µg/µl BSA-st, 2,5 µl-st restrikteeritud ja puhastatud pGEX-4T1 plasmiidist ja 2,5 µl-st restrikteeritud ja puhastatud sisend DNA-st (*ΔG386*, *ΔV413*, *ΔR435*, *ΔS480*). Ligeerimisreaktsioon toimus toatemperatuuril 1-2 h.

2.2.5.3 *E. coli* DH5α transformeerimine ligeeritud vektorplasmiididega

E. coli DH5α rakke transformeeriti eelnevas etapis (2.2.5.2) saadud ligeerimisseguga. Iga transformatsiooni jaoks võeti 30 µl-t kompetentseid *E. coli* DH5α rakke, millele lisati 1 µl ligeerimisseguga ja õrnalt suspendeeriti, protsess toimus 0 °C juures jääl. Rakke ja ligeerimisseguga hoiti 30 min jääl, pärast mida tehti rakkudele kuumašokk - 2 min jooksul hoiti rakke ja ligeerimisseguga 37 °C juures. Pärast kuumašokki rakud jahutati jää peal ning lisati rakkudele 500 µl-t LB söödet (+ 20 mM MgSO₄ ja 0,8% Glükoos) ning hoiti 30 min 37 °C juures. Seejärel plaaditi 100 µl-t rakke selektiivsele LB Amp 100 µg/ml tardsöötmele ning kasvatati üleöö (ON – *over night*) 37 °C juures.

2.2.5.4 Plasmiidsete ekspressioonivektorite väljapuhastamine ja kontroll

Tardsöötmele kasvavate ekspressioonivektorit sisaldavate DH5α rakkude hulgast valiti iga ekspressioonivektori kohta kolm kolooniat ja kasvatati loksutil ON 37 °C juures 2,5 ml-s LB vedelsöötmes, millele oli lisatud Amp 100 µg/ml lõppkontsentratsioonini.

Pärast kasvamist tsentrifuugiti baktereid 4000 rpm 5 minutit *Eppendorf Mini Spin* tsentrifuugiga (rootor F45 12-11), mida kasutati kõigis antud etapi tsentrifuugimistes. Pärast tsentrifuugimist eemaldati supernatant ning töötati edasi 0 °C juures jääl. Rakkudele lisati 100 µl SOL I (25mM Tris HCl [pH 8,0], 50mM glükoos, 10mM EDTA) ja segati. Seejärel lisati 200 µl SOL II (0,2 M NaOH; 1% SDS) ning hoiti 5 min jääl. Edasi lisati 150 µl SOL III (3 M kaaliumatsetaat; 5 M äädikhape), segati ning hoiti jääl 10 min. Lahust tsentrifuugiti 13400 rpm juures 5 min ja pärast seda eemaldati supernatant. Supernatandile lisati 65% supernatandi ruumalast isopropanooli, 0,3 ml. Lahusele tehti vortex ning hoiti 5 min RT, mille järel tsentrifuugiti lahust 13400 rpm 10 min. Eemaldati supernatant ja lisati 100 µl 80% EtOH-d ja hoiti lahust 5 min RT. Seejärel tsentrifuugiti lahust 13400 rpm 5 min ja eemaldati supernatant.

DNA sade lahustati 100 µl-s T₁₀E₁ puhvris ning inkubeeriti 30 min 65 °C juures koos lisatud RNAasA-ga 20 µg/ml.

Puhastatud plasmide kontrolliti 0,8% agarosgeelil. Lisaks teostati restriksioonanalüüs BamHI ja SalI restriктаasidega. Restriksioonisegu sisaldas: 2xYellow puhvrit (*Thermo Fischer Scientific*), puhastatud plasmidi (8 µl) ning 5U BamHI ja 5U SalI. Reaktsioonisegu ruumala viidi 20 µl-ni ddH₂O-ga.

Restriksioonireaktsioon toimus 37 °C 2-3 h. Reaktsiooni lõppedes uuriti restrikteeritud plasmide 1,2% agarosgeelil.

pGEX 4T1-Δ28IRC mutantsete plasmiidide korrektsuse kontrolliks saadeti 300 ng plasmiidset DNA-d ja 2 pmol praimereid (kirjeldatud tabelis 3) Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse sekveneerimisse. Sekveneeritud järjestusi analüüsiti programmis Vector NTI 11.

2.2.6 Valkude ekspressioon

GST-Δ28 Irc3 rekombinantsete mutantsete valkude ekspresseerimiseks kasutati BL21RIL tüve. 30 µl BL21RIL kompetentseid rakke transformeeriti 1 µl puhastatud ekspressioonivektoriga sarnaselt peatükis 2.2.5.3 kirjeldatule ning plaaditi LB Amp 100µg/ml Cam 25µg/ml tardsöötmele. Rakke kasvatati 37 °C juures ON.

Tardsöötmel kasvatatud *E. coli* BL21RIL pGEX-4T1 Δ28 IRC3 kolooniate hulgast valitud rakke kasvatati seejärel loksutil 180 rpm 10 ml-s LB vedelsöötmes 37 °C juures (Amp 100 µg/ml, Cam 25 µg/ml). Seejärel inokuleeriti *E. coli* BL21RIL pGEX-4T1 Δ28 IRC3 rakud 1L (eelkatse puhul 0,1L) M9Ca söötmesse (Amp 100µg/ml, Cam 50µg/ml), mille lõplik OD₆₀₀ = 0,05 ja kasvatati 30 °C juures kuni OD₆₀₀ ~0,6. Valguekspressioon indutseeriti IPTG lisamisega 0,1 mM lõppkontsentratsioonini, pärast mida kasvatati rakke 6 h enne kogumist. Enne valkude puhastamist võeti 100 µl rakke valguanaluüsiks SDS-PAGE kasutades.

2.2.7 Valkude puhastamine

2.2.7.1 Rakkude kogumine ja lüüsimine

Kõik valgupuhastusega seotud protseduurid viidi läbi 4 °C juures ning kasutati jääkülmi töölahuseid, kui pole märgitud teisiti.

E. coli pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 rakud tsentrifuugiti 10 min 5000 rpm *Sorvall RC5B Plus* GS3 rootoriga 4 °C juures pärast induksiooniga ja eemaldati seejärel sööde. Rakke pesti 10 ml STE puhvriga (10 mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 M NaCl, 1mM EDTA [pH 7,5], ddH₂O) ja tsentrifuugiti seejärel *Hettich Universal 32R*'ga (rootor 1617 *swing-out*) 4 °C juures 3500 rpm 15 min ja eemaldati sööde. Rakud külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures.

Rakud sulatati lüüsimiseks 4 °C juures ja lisati (10 ml eelkatse puhul) 20 ml lüüsipuhvrit (300 mM NaCl, 50 mM Tris HCl [pH 8], 1 mM PMSF ja ditiotreitol (DTT) 1mM *ex tempore*) ning suspendeeriti rakke. Seejärel lisati lüsotsüüm (*AppliChem*) 2 mg/ml lõppkontsentratsioonini ning lüüsi rakke 30 min. Pärast rakkude lüüsimist lisati 25 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂ lõppkontsentratsioonini ning 50U DNAasi (eelkatse puhul 25U DNAasi). Rakke inkubeeriti 20 min ja rakulüsaati sonikeeriti pärast seda ultraheliga 3 x 20 sekundit 60W võimsusega *Bandelin Sonopuls HD2070* sonikaatoriga. Sonikeeritud rakulüsaati tsentrifuugiti *Sorvall RC5B Plus* SS34 rootoriga 20 min 12000 rpm 4 °C juures ja rakulüsaat eraldati. SDS-PAGE analüüsiks võeti 20 µl rakulüsaati ning ülejäänud lüsaati kasutati edasistes puhastusetappides.

2.2.7.2 Puhastamine väikeses mahus ekspressiooni kontrolliks

Eelnevas etapis (vt peatükk 2.2.7.1) eemaldatud rakulüsaadile lisati järk-järgult GST- $\Delta 28$ Irc3 mutantide väljasoolamiseks magnetsegajal segades 60% küllastumiskontsentratsioonini ammooniumsulfaati. Seejärel tsentrifuugiti ammooniumsulfaadiga küllastunud rakulüsaati 12000 rpm 4 °C juures 20 min *Sorvall RC5B Plus* SS34 rootoriga ning supernatant eemaldati. Sadestunud valgud lahustati 5 ml lüüsipuhvril (koostist vt 2.2.7.1). Järgneva sammu ettevalmistamiseks pesti glutatioon agarooos suspensiooni (GST FF - *Glutathione SepharoseTM 4 Fast Flow*, *GE Healthcare*) 2,5 ml ddH₂O-ga 3 x ning 1,25 ml LB-ga 2 x, iga pesu järel tsentrifuugiti suspensiooni 1,5 min 950 rpm 4 °C juures *Hettich Universal 32R*'ga (rootor

1617 *swing-out*) ning eemaldati supernatant. Lahustatud sademele lisati 250 µl pestud GST FF-i ning segati *end-over-end* segajas (*Bio RS-24, Biosan*) 2 h 4 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti suspensiooni 1,5 min 950 rpm 4 °C juures *Hettich Universal 32R*'ga (rootor 1617 *swing-out*) ning eemaldati supernatant.

GST FF maatriks kanti pärast tsentrifuugimist pestud kolonnile (*Bio Rad Poly-Prep*® 10 ml) ning maatriksit suspendeeriti ja pesti 5 x maatriksi ruumalaga elueerimispuhvriga (EB) (300 mM NaCl, 50 mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 mM EDTA, 10% glütserool, 1mM DTT *ex tempore*). GST FF maatriksit pesti EB-ga kaks korda. Seejärel pesti GST FF maatriksist 250 µl EB-ga, mis sisaldas 1 M NaCl ning koguti eluent, etappi korraldati 2 korda.

Seejärel suspendeeriti GST FF maatriksit 250 µl 10 mM glutatiooni (*AppliChem*) sisaldava elueerimispuhvriga ning pesti 10 min, pärast mida koguti eluent. Etappi korraldati viies korduses. Valkude puhastamise käigus koguti erinevatest puhastamise etappidest ja fraktsioonidest 20 µl kaupa proove, millega teostati hiljem SDS-PAGE analüüs puhastusefektiivsuse hindamiseks.

Sobilike fraktsioonide kogumiseks hinnati Bradfordini meetodit ja SDS-PAGE kasutades fraktsioonide valgusisaldust.

2.2.7.3 Puhastamine suures mahus

Tsentrifuugitud ja eraldatud sonikeeritud rakulüsaadile (vt peatükk 2.2.7.1) lisati järk-järgult ebaoluliste valkude väljasoolamiseks magnetsegajal segades 30% küllastumiskontsentratsioonini ammooniumsulfaati. Seejärel tsentrifuugiti ammooniumsulfaadiga rakulüsaati 12000 rpm 4 °C juures 20 min *Sorvall RC5B Plus* SS34 rootoriga ning rakulüsaat eemaldati edasisteks sammudeks. Sade lahustati seejärel 10 ml-s lüüsipuhvris (koostist vt peatükist 2.2.7.1). Eemaldatud rakulüsaadile lisati 60% küllastumiskontsentratsioonini ammooniumsulfaati, et sadestada GST-Δ28 Irc3 mutantset valku sisaldav fraktsioon. Seejärel tsentrifuugiti 60% ammooniumsulfaadiga küllastunud lüsaati 12000 rpm 4 °C juures 20 min *Sorvall RC5B Plus* SS34 rootoriga, eemaldati supernatant ja sade lahustati 10 ml-s lüüsipuhvrid. Järgnevatel sammudel kasutatavat GST FF maatriksit pesti 3 x 5 ml ddH₂O ja 2,5 ml LB-ga 2 x, iga pesu järel tsentrifuugiti suspensiooni 1,5 min 950 rpm 4 °C juures *Hettich Universal 32R*'ga (rootor 1617 *swing-out*). Lahustatud sademele lisati 500 µl GST FF-i ning segati *end-over-end* segajas (*Bio RS-24, Biosan*) 2 h 4

°C juures. Seejärel tsentrifuugiti suspensiooni 1,5 min 950 rpm 4 °C juures *Hettich Universal 32R* ga (rootor 1617 *swing-out*) ning eemaldati supernatant.

GST FF maatriks kanti pärast tsentrifuugimist pestud kolonnile (*Bio Rad Poly-Prep* ® 10 ml) ning maatriksit suspendeeriti ja pesti 5 ml EB-ga kahes korduses (koostist vt peatükist 2.2.7.2.). Järgnevalt pesti kolonni 5 ml 1 M NaCl sisaldusega EB-ga. Seejärel suspendeeriti ja pesti GST FF maatriksist 10 min 1 ml EB-ga, mis sisaldas 10 mM lõppkontsentratsiooniga glutatiooni ning koguti valgufraktsioonid, antud etappi korralti 3 korda.

Valkude puhastamise käigus koguti erinevatest puhastamise etappidest ja fraktsioonidest proove, millega teostati hiljem SDS-PAGE analüüs puhastusefektiivsuse hindamiseks.

2.2.7.3.1 Rekombinantse GST-Δ28 Irc3 valgu lõikamine trombiiniga

Rekombinantselt GST-Δ28 Irc3 valgult GST liitvalgu osa eemaldamiseks lisati valgufraktsioonidele inimese vereplasma trombiini (*Calbiochem*) lõppkontsentratsiooniga 1U/μl ning CaCl₂ 2,5 mM lõppkontsentratsioonini ning inkubeeriti ON jääl. Reaktsioon peatatati 1 mM lõppkontsentratsioonini PMSF-i lisamisega.

2.2.7.3.2 S-sepharose katioonvahetuskromatograafia

Δ28 Irc3 mutantide eraldamiseks GST markervalgust kasutati *S-sepharose* katioonvahetuskromatograafia maatriksiga täidetud kolonni (*GE Healthcare*). 0,5 ml *S-sepharose* maatriksist pesti 5 ml ddH₂O-ga ning 2 ml 1 M NaCl sisaldusega EB puhvriga (1 M NaCl, 50 mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 mM EDTA, 10% glütserool, 1mM DTT *ex tempore*) ning 5 ml S puhvriga (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 mM EDTA, 10% glütserool, 1mM DTT *ex tempore*) ning kanti seejärel kolonnile (*Bio Rad Poly-Prep* ® 10 ml). Δ28 Irc3 mutantsed trombiiniga lõigatud valgud lahjendati 100 mM NaCl lõppkontsentratsioonini ilma NaCl-ta S puhvrit kasutades ja kanti kolonnile. Kolonni pesti 2 ml S puhvriga ning elueeriti seejärel 500 μl järgmiste S puhvritega, mille NaCl sisaldus oli 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM ning 600 mM.

Kogutud fraktsioone analüüsiti SDS-PAGE ja Bradfordi meetodit kasutades. Edasiseks biokeemilise aktiivsuse analüüsiks koguti enim Δ28 Irc3 mutante sisaldavad fraktsioonid kokku ning külmutati -80 °C juures.

2.2.8 Valguanalüüs

2.2.8.1 Polüakrüülamiidgeelelektroforees (PAGE)

Valguanalüüsi käigus kasutati 10 x 10 cm 10% akrüülamiid/bisakrüülamiidgeeli (Sambrook ja Russel, 2001). Geelil jooksutatud proovid denatureeriti SDS puhvris (25 mM Tris-HCl [pH 6,8], 50mM DTT, 2% SDS, 0,1% broomfenoolsinine, 5% glütserool) 95 °C juures 5 min. Elektroforees toimus RT 10-13 V/cm 2,5 – 3h. Foreesipuhvrina kasutati SDS puhvrit (0,4 M glütsiin, 50mM Tris, 0,1% SDS), kui pole märgitud teisiti.

Geelides jooksutatud proovide visualiseerimiseks värviti geele *Coomassie* briljantsinist sisaldavat värvilahusega (25% etanool, 7% äädikhape, 2,5mg/ml *Coomassie Brilliant Blue* R-250) RT 24h ning pesti 2-4 h RT värvieemaldis (25% etanool, 7% äädikhape).

Suurusmarkerina kasutati 14-116 kDa *Fermentas unstained Marker*'it (*Fermentas* #26610) ning valkude kontsentratsiooni määramisel võrdlusena teatud kontsentratsiooniga BSA-d.

2.2.8.2 Valgu kontsentratsiooni hindamine Bradfordin meetodil

Puhastatud valgufraktsioonides valgukoguse hindamiseks kasutati Bradfordin meetodit (Bradford, 1976). Mikroitiiterplaadile pipeteeriti 5 µl kogutud valgufraktsiooni ning 50 µl Bradfordin reagenti (0,01% *Coomassie brilliant blue* G-250, 5% etanool, 4,25% fosforhape). Proove suspendeeriti ja inkubeeriti 10 min 4 °C juures ning hinnati seejärel visuaalselt reaktsioonide värvumist. Sobilike fraktsioonide säilitamiseks ja kokku kogumiseks hinnati Bradfordin meetodil valgufraktsioonide värvumist.

2.2.8.3 Kontsentratsiooni määramine Nanodropiga

Valkude täpse kontsentratsiooni teada saamiseks mõõdeti valkude neelduvust λ280 juures *NanoDrop2000c UV-Vis* spektrofotomeeriga. *ExPASy ProtParam* veebiprogrammiga arvutati valgumutantide neelduvustegurid, lähtudes valgumutantide aminohappelisest järjestusest ning Nanodrop2000 tarkvaraga arvutati neelduvustegureid arvesse võttes valkude kontsentratsioon.

2.2.8.4 X₁₂ substraadi konstrueerimine

Valkude DNA sidumisaktiivsuse määramiseks loodi radioaktiivselt märgistatud X₁₂ substraat. Valkude DNA sidumisaktiivsuse määramiseks loodud X₁₂ märgistati $\gamma^{32}\text{P}$ -ga. Järgnevates reaktsioonides kasutati *Thermo Fisher Scientific* puhverlahuseid ja ensüüme. Oligonukleotiidi kineerimine toimus 12 μl -s reaktsioonisegus, mis sisaldas järgnevaid komponente: 1,2 μl [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP (*Hartmann Analytic* 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 12 pmol oligonukleotiidi, 1x PNK puhvrit A, 0,5 μl T4 PNK ning ddH₂O-d ruumala korrigeerimiseks. Reaktsioonisegu inkubeeriti 37 °C juures 30-60 min ning reaktsioon peatati 75 °C juures 10 min inkubeerides. 2 μl kineeritud oligonukleotiidi lahjendati 20 kordselt 38 μl -s TEN puhvrts (10 mM Tris [pH 7,5], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl).

Kineerimise efektiivsuse hindamiseks võeti 2 μl proovi kahes korduses ning kanti need DEAE paberile. Ühte proovi pesti 3 korduses 15 ml 0,25 M (pH 7,5) Na₂PO₄-ga 5 min. Seejärel mõõdeti mõlemale DEAE paberile jäänud radioaktiivse märgise hulka. Selleks lisati DEAE paberid 5 ml stsintillatsioonivedelikku *Scintisafe3* (*Thermo Fisher Scientific*) ning analüüsiti stsintillatsioon-analüsaatoriga *Liquid scintillation analyzer TriCarb 2800 TR* (*Perkin Elmer*).

X₁₂ substraadi loomiseks oligonukleotiididest segati kokku 20 μl reaktsioonisegu, mis koosnes järgmistest komponentidest: 10 μl 1 pmol/ μl radioaktiivselt märgistatud oligonukleotiidi, 1 x *Yellow* puhver (*Thermo Fisher Scientific*), 1,2 μl 10pmol/ μl vastavaid oligonukleotide (2; 3; 4) ning ddH₂O. Reaktsiooni inkubeeriti 5 min 75 °C juures ja jahutati seejärel termoblokkide vahel toatemperatuurini. Substraadiga töötati edasi 4 °C juures või jääl, kui pole mainitud teisiti.

Seejärel eraldati kokku sulandunud radioaktiivselt märgistatud X₁₂ substraat kokku sulandumata oligonukleotiididest PAGE meetodil 4 °C juures 10% TBE (89 mM Tris, 89 mM Boorhape, 2 mM EDTA-Na₂) foreesipuhvrit kasutades. Akrüülamiidgeelist tehti röntgenfilmiga pilt, et tuvastada radioaktiivse substraadi asukoht akrüülamiidgeelil, kasutati *AgfaPhoto* röntgenfilme ja lahuseid. Röntgenfilmi inkubeeriti pimedas toas 5 min, pärast mida ilmutati röntgenfilmi 2 min ilmutis, loputati vees ning seejärel hoiti 2 min kinnitis. Akrüülamiidgeelist lõigati välja radioaktiivset X₁₂ substraati sisaldav geelilõik ning lahustati 20 μl -s TEN puhvrts. Lahustatud proovi segati ON 4 °C juures *end-over-end* segajas (*Bio RS-24*, *Biosan*).

Seejärel proovid tsentrifuugiti 10 min RT-l 14000 rpm *Eppendorf Centrifuge 5415c* tsentrifuugi standardse rootoriga. Supernatant eemaldati ja filtreeriti 42mm Φ GF92

Schleicher & Schuell filterpaberiga. Filtreeritud supernatandile lisati 20 ng dekstraani DNA visualiseerimiseks ning 4 x supernatandi ruumala 96% EtOH-d. Seejärel X_{12} substraati sadestati 2-3 h -20 °C juures ning tsentrifuugiti 10 min RT-l 14000 rpm *Eppendorf Centrifuge 5415c* tsentrifuugi standardse rootoriga. Supernatant säilitati ja sade lahustati 50 µl TEN-is. Seejärel võeti 3 µl lahustatud sadet ning lisati see 5 ml stsintillatsioonivedelikku *Scintisafe3* (*Thermo Fisher Scientific*) ning analüüsiti stsintillatsioon-analüsaatoriga *Liquid scintillation analyzer TriCarb 2800 TR* (*Perkin Elmer*).

2.2.8.5 ATPasse aktiivsuse määramine

ATPaasse aktiivsuse määramiseks kasutati Kuusk jt. poolt väljatöötatud modifitseeritud protokoll (Kuusk jt., 2002). Kõikides valgu analüüsimiseks tehtud valgulahjendustes kasutati Irc3 lahjenduspuhvrit (450 mM NaCl, 20 mM Tris HCl [pH 7,5], 0,1 mM EDTA, 10% glütserool, 0,1 mg/ml BSA, 1mM DTT *ex tempore*). Reaktsiooni lõplik ruumala oli 20 µl ja koosnes järgnevate lõppkontsentratsioonidega komponentidest 7 mM MgCl₂, 30 mM Tris [pH 7,5], 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 0,1mM ATP, 50000 impulssi minutis (*counts per minute - cpm*) [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP (*Hartmann Analytic* 50µCi/µl), 50 ng DNA substraati ja 0,331 pmol $\Delta 28$ Irc3 mutantset valku.

19 µl reaktsioonisegu eelkuumutati 37 °C juures 5 min ning lisati seejärel 1 µl 0,331 pmol $\Delta 28$ Irc3 mutantset valku reaktsiooni kohta. Reaktsioone inkubeeriti 37 °C juures 0; 1; 2,5; 5; 10; 15 ja 20 minutit ning peatati 150 µl stopp-lahusega. Stopp-lahus sisaldas 2 mM KH₂PO₄ 0,036% (v/v) HCl, aktiivsütt 0.8% (w/v) *Norit A 100 mesh* (*Aldrich Chemical Company, Inc*). Proove segati 10 min loksutil *Eppendorf Mixer 5432*. Seejärel proovid tsentrifuugiti 2 min 13400 rpm *Eppendorf Centrifuge 5415c* tsentrifuugi standardse rootoriga. 100 µl supernatanti eemaldati ning segati 150 µl stopp-lahusega, pärast mida segati ja tsentrifuugiti proovid eelpool kirjeldatuga sarnaselt. Tsentrifuugitud proovist eemaldati 155 µl supernatanti ning tsentrifuugiti eelpool kasutatud tsentrifuugiga 4 min. Seejärel võeti 150 µl supernatanti ning lisati see 5 ml-sse stsintillatsioonivedelikku *Scintisafe3* (*Thermo Fisher Scientific*) ning analüüsiti stsintillatsioon-analüsaatoriga *Liquid scintillation analyzer TriCarb 2800 TR* (*Perkin Elmer*). Loendatud impulsside arvu (*cpm*) kaudu arvutati hüdrolüüsitud ATP moolide hulk. DNA substraadina kasutati puc 19+80 tsirkulaarset plasmidi (Tiina Sedmani puhastatud). Kõiki ATPasse aktiivsuse määramise katseid tehti vähemalt kolmes korduses.

2.2.8.6 Valkude DNA sidumisvõime määramine

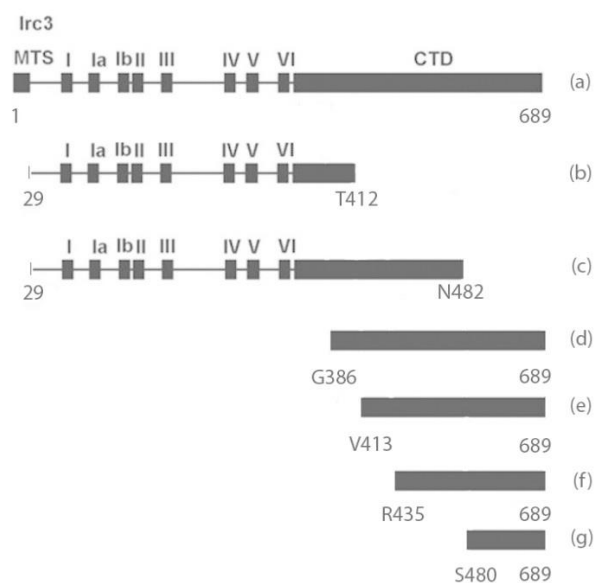
Valkude DNA sidumisvõime määramiseks tehtud katsed teostati jääl või 4 °C juures. Substraadina kasutatud puc 18 EcoRI plasmiid saadi Tiina Sedmanilt. Reaktsioonid teostati 10 µl-s reaktsioonisegus, mis sisaldas järgnevaid komponente: 1 x *Bandshift* puhver (20 mM Tris HCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA, 10% glütserool), 0,4 µl 2,5 nM X₁₂ substraati, 1 µl 10ng/µl lineariseeritud puc 18 EcoRI plasmidi, 1 µl analüüsitava valgu lahjendust ning ddH₂O-d ruumala korrigeerimiseks. Valkude DNA sidumisvõime määramisel kasutati 0 nM; 0,5 nM; 1 nM; 2 nM; 4 nM ja 8 nM. lõppkontsentratsiooniga uuritavaid Irc3 valke. Valkude lahustamisel kasutati Irc3 lahjenduspuhvrit (vt koostist 2.2.8.5.).

Pärast reaktsioonisegu kokku segamist inkubeeriti reaktsiooni 10 min jääl ning pärast seda kanti 8 µl reaktsioonisegu 2V/cm pinge juures 5 % AA/bis geelile. Enne proovide geelile kandmist tehti 5 % AA/bis geelile 10V/cm 1,5 h RT preforees ning vahetati foreesipuhver. 5% AA/bis geelidega teostatud elektroforees toimus TBE puhvris 4 °C juures 1h 15V/cm pinget kasutades. 5% AA/bis geelid kanti pärast elektroforeesi filterpaberile ning kuivatati 30 min 80 °C juures. Seejärel eksponeeriti *Storage phosphor screen*'i (Amersham) kuivatatud geelis paiknevate proovidega ON ning analüüsiti *Fluoro/phosphoimager Typhoon Trio W/Workstation* (GE Healthcare) abil.

2.3 Tulemused

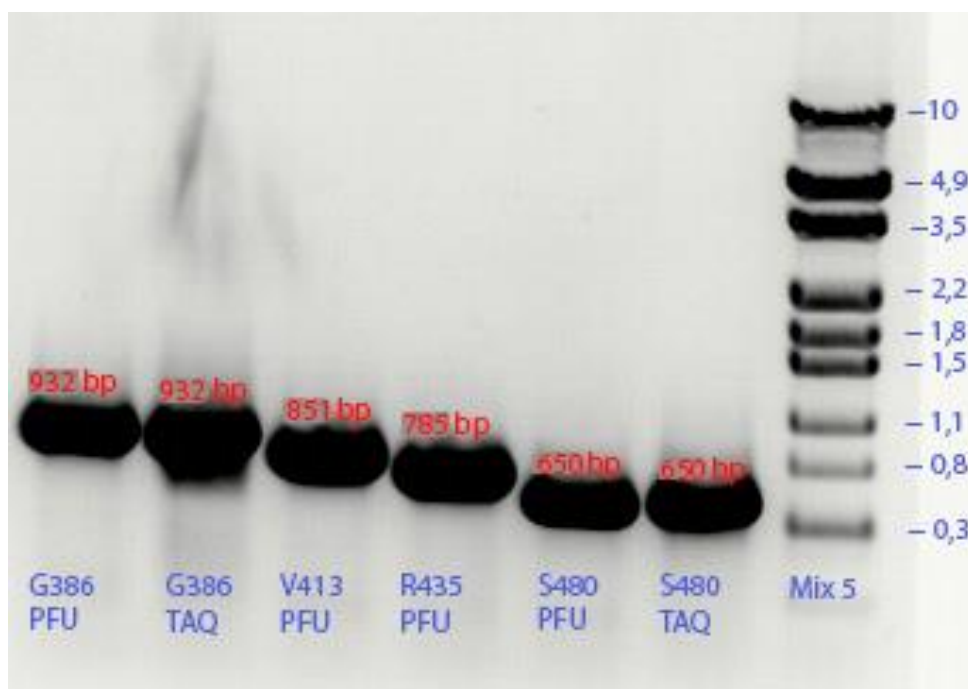
2.3.1 $\Delta 28$ IRC3 mutantsete ekspressioonivektorite loomine

Bakalaureusetöö eesmärkide täitmiseks tuli esmalt konstrueerida ekspressioonivektorid. Selleks amplifitseeriti PCR'i kasutades sarnaselt peatükis 2.2.3 kirjeldatule IRC3F G386-BamHI/IRC3R Stop-SalI, IRC3F R435-BamHI/IRC3R Stop-SalI, IRC3F S480-BamHI/IRC3R Stop-SalI, IRC3F V413-BamHI/IRC3R Stop-SalI praimeripaare. Maatriitsina kasutati pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 plasmidi, millel puudus mitokondriaalse lokalisatsiooni signaal. Amplifitseeritud sisend DNA lõikude kodeeritud valgud on toodud näidatud Joonisel 8 (Joonis 8). Praimerid sisaldasid endas EcoRI ja BamHI restriктаaside lõikesaite, mis olid olulised edasistes kloneerimistöödes. Praimerite paaridega sünteesitud sisend DNA lõigud olid järgneva pikkusega: 932 bp $\Delta G386$, 851 bp $\Delta V413$, 785 bp $\Delta R435$, 650bp $\Delta S480$.



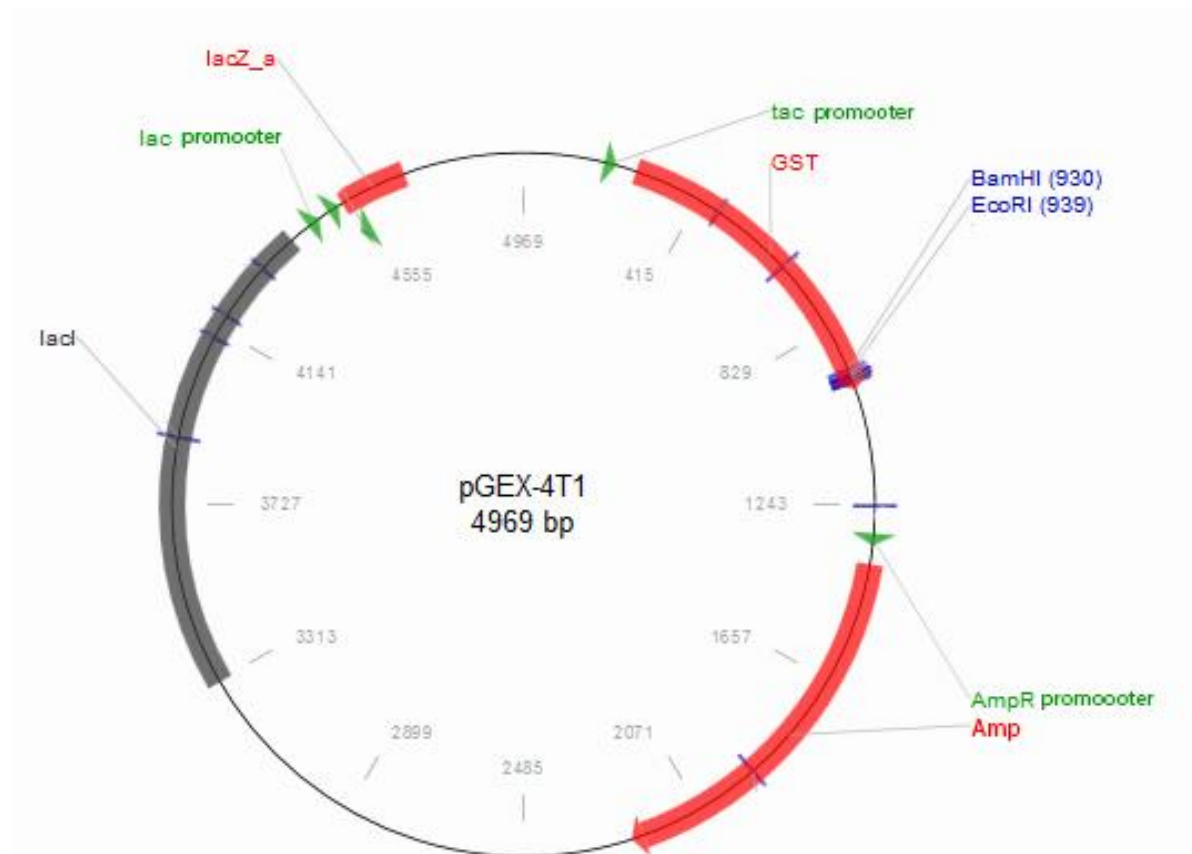
Joonis 8. Irc3 valgud. Joonisel on näidatud sisend DNA poolt kodeeritavaid valgulõigud. Tähed aminohapete positsioonide ees tähistavad seal asuvaid aminohappeid. (a) Täispikkuses Irc3 valk. (b) Ilma mitokondriaalse transportsignaali $\Delta 28$ Irc3 valk, mida kasutati bakalaureusetöös referentsvalguna. Mitokondriaalse transpordi signaali eemaldamine oli oluline uuritavate valkude korrektseks kokku pakkimiseks. (c) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta N482$ ehk $\Delta N482$ valk. (d) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta T412$ ehk $\Delta T412$ valk. (e) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta G386$ ehk $\Delta G386$ valk. (f) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta V413$ ehk $\Delta V413$ valk. (g) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta R435$ ehk $\Delta R435$. (h) $\Delta 28$ Irc3 $\Delta S480$ ehk $\Delta S480$ valk. $\Delta T412$ ja $\Delta N482$ rekombinantseid liitvalke kodeerivad ekspressioonivektorid saadi Juhan Sedmani käest (Sedman jt., 2014 järgi). ΔN – Irc3 C-terminaalne valgufragment ja ΔC – Irc3 N-terminaalne valgufragment.

PCR'i efektiivsuse kontrollimiseks teostati sisend DNA-ga AGE 0,8% agarosgeeliga.



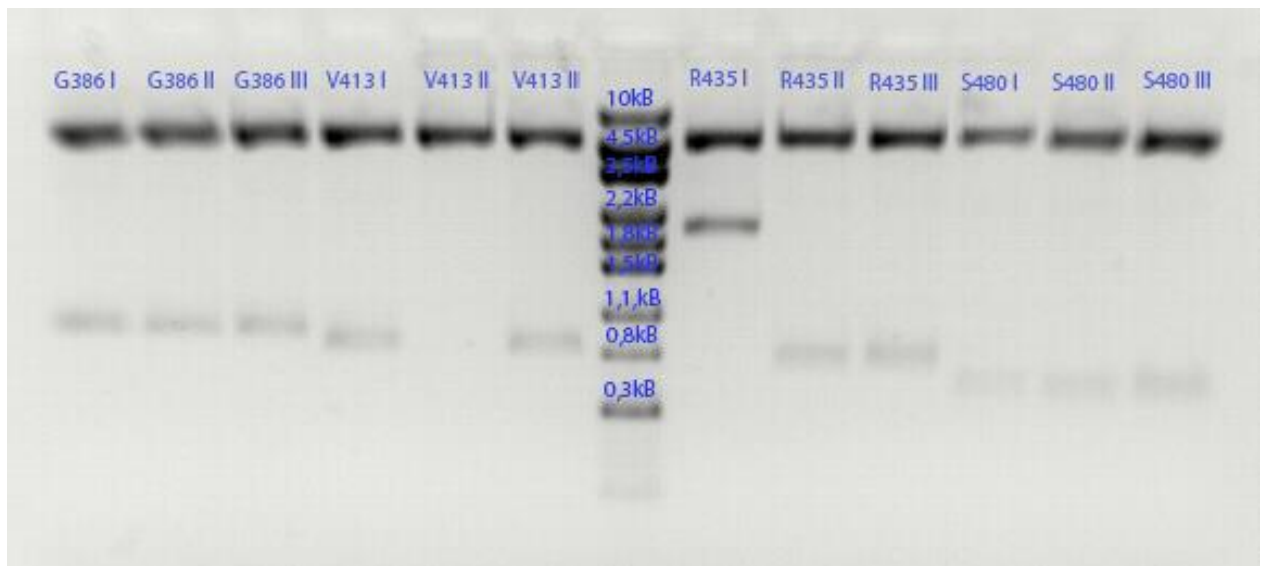
Joonis 9. Praimerite kontroll. Punasega on märgitud sisend DNA lõikude pikkused. Mix 5 markeri DNA lõikude suurus on toodud kilobaasides. Kloneerimisel kasutati Pfu polümeraasiga amplifitseeritud sisend DNA lõike, kontrolliks kasutati Taq polümeraasidga amplifitseeritud sisend DNA lõike. G386 - NΔG386 valku kodeeriv sisend DNA. V413 – NΔV413 valku kodeeriv sisend DNA. R435 - NΔR435 valku kodeeriv sisend DNA. S480 - NΔS480 valku kodeeriv sisend DNA.

Pfu polümeraasiga amplifitseeritud sisend DNA puhastati seejärel fenooltöötlusega nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.5.1. Järgnevalt restrikteeriti (kirjeldatud peatükis 2.2.5.2) fenooltöötlusega puhastatud sisend DNA fragmendid ning plasmiidne pGEX-4T1 DNA ja selekteeriti seejärel AGE kasutades. Pärast restrikteeritud sisend DNA fragmentide ning pGEX-4T1 plasmiidse DNA selekteerimist agarosgeelil ja puhastamist vastavalt *UltraClean® 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc)* protokollile lahustati puhastatud DNA 30 µl-s T₁₀E₁-s. Seejärel ligeeriti sarnaselt peatükis 2.2.5.2 kirjeldatule restrikteeritud sisend DNA ning pGEX-4T1 plasmiid. Sisend DNA ligeeriti pGEX-4T1 BamHI 930 nt lõikesaidi ja EcoRI 939 nt lõikesaidi vahele (Joonis 10).



Joonis 10. Ekspressioonivektorite konstrueerimiseks kasutatud pGEX-4T1. Ekspressioonivektorite konstrueerimiseks kasutatud pGEX 4T-1 plasmidi ning sisend DNA-d lõigati EcoRI ja BamHI restriktasididega ning ligeeriti seejärel (*Addgene* vektorite andmebaasi järgi).

Loodud ekspressioonivektorite paljundamiseks transformeeriti DH5 α rakke 1 μ l ligeerimisseguga (kirjeldatud peatükis 2.2.5.3) ning kasvatati ON. Seejärel valiti DH5 α pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* nelja mutandi tardsöötmetelt 3 kolooniat ning kasvatati neid 37 °C juures 2,5 ml-s LB (Amp 100 μ g/ml) vedelsöötmes, üles kasvatamist korrati kolmes korduses. Seejärel eraldati DH5 α rakkudest ekspressioonivektorite plasmiidne DNA (kirjeldatud peatükis 2.2.5.4), mis lahustati 100 μ l-s T₁₀E₁ DNA säilituspuhvris. Seejärel kontrolliti pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* mutantsete ekspressioonivektorite DNA-d 0,8% agarosgeelil ning teostati restriksioonanalüüs ekspressioonivektorite DNA-ga ning analüüsiti restrikteeritud plasmidi fragmente 1,2% agarosgeelil (Joonis 11). Kõikidest Δ 28 *IRC3* mutantidest õnnestus luua ekspressioonivektorid. pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* Δ G386, pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* Δ S480 kolmes korduses ning pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* Δ V413, pGEX-4T1 Δ 28 *IRC3* Δ R435 kahes korduses. Joonisel 11 on näha, et V413 II ning R435 I ekspressioonivektorite ligeerimine ei õnnestunud.

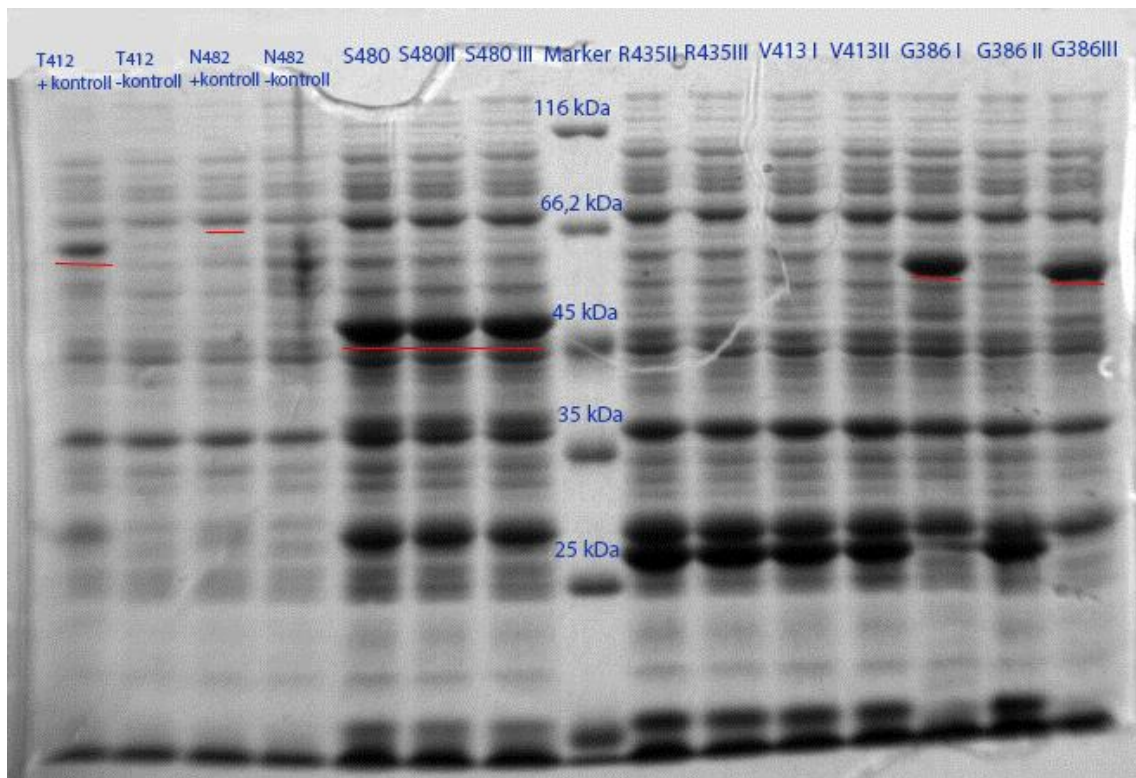


Joonis 11. Restrikteeritud ekspressioonvektorid. Jooniselt on näha puhastatud ekspressioonivektoritele teostatud restriksioonanalüüsi järel tekkinud DNA fragmendid. V413 II ning R435 I ekspressioonivektorite ligeerimine ei õnnestunud.

2.3.2 Valkude ekspresseerimine

GST- $\Delta 28$ Irc3 rekombinantsete mutantsete valkude ekspresseerimiseks kasutati BL21RIL tüve. 30 μ l BL21RIL kompetentseid rakke transformeeriti 1 μ l puhastatud ekspressioonivektoriga sarnaselt peatükis 2.2.5.3 kirjeldatule ning kasvatati sarnaselt peatükis 2.2.2.6 kirjeldatule. OD₆₀₀ ~0,6 juures indutseeriti valguekspressioon IPTG lisamisega 0,1 mM lõppkontsentratsioonini, pärast mida kasvatati rakke 6 h enne kogumist. Rakkude kasvatamise protokoll oli sarnane metsiktüüpi valgu ekspresseerimise protokolliga. Enne rakkude kogumist võeti söötimest 100 μ l söödet analüüsimiseks ning teostati sellega SDS-PAGE sarnaselt peatükis 2.2.8.1 kirjeldatule.

Eelkatse puhul ei õnnestunud kõigilt neljalt - pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 Δ G386, pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 Δ S480, pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 Δ V413, pGEX-4T1 $\Delta 28$ IRC3 Δ R435 – ekspressioonivektorilt GST- $\Delta 28$ Irc3 rekombinantset ja mutantset valku ekspresseerida (Joonis 12). Ekspresseerusid ainult GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ G386 ja GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ S480 valgud. Võttes arvesse valkude aminohappelisi järjestusi, arvutati rekombinantsete valkude teoreetilised molekulmassid. GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ G386 M_w=60,8 kDa, GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ V413 M_w= 58,2kDa, GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ R435 M_w= 55,6kDa, GST- $\Delta 28$ Irc3 N Δ S480 M_w= 50,5 kDa, GST- $\Delta 28$ Irc3 C Δ N482 M_w= 77kDa , GST- $\Delta 28$ Irc3 C Δ T412 M_w=69,3kDa.



Joonis 12. Eelkatses ekspresseerunud valgud. Punase joonega on alla joonitud ekspresseerunud GST- Δ 28 Irc rekombinantseid valgud. Postiivse ja negatiivse kontrollina on kasutatud ekspressioonivektoritelt IPTG-ga indutseeritud GST- Δ 28 Irc3 C Δ T412 ja GST- Δ 28 Irc3 C Δ N482 valkude SDS proove ning indutseerimata vektorite SDS proove. Markerina kasutati *Fermentas unstained marker*’it. Esimeses eelkatses ekspresseerusid GST- Δ 28 Irc3 N Δ G386 ja GST- Δ 28 Irc3 N Δ S480 valgud.

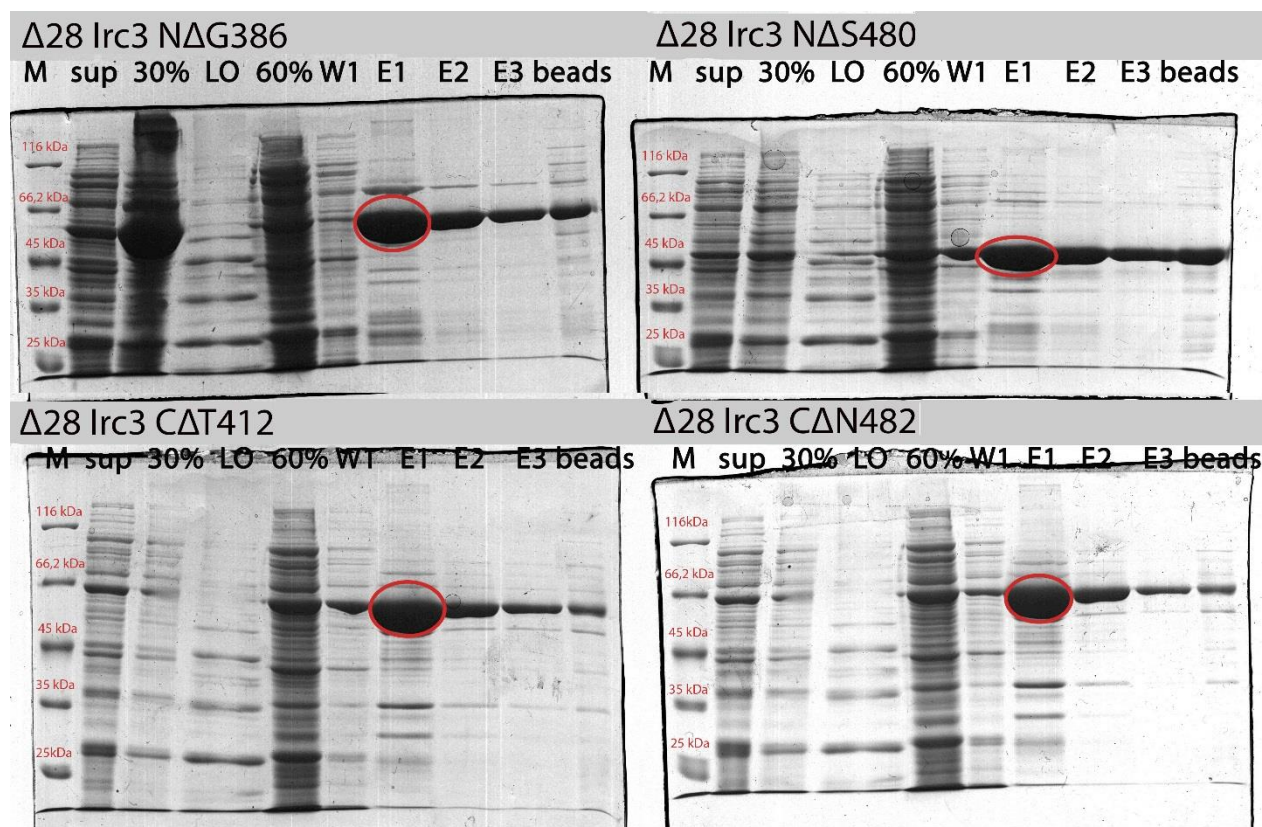
Edasistes töodes kasutati valkude ekspresseerimiseks pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ G386, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ S480, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ T412, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ N482 ekspressioonivektoreid. pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ T412, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ N482 ekspressioonivektorite valguekspressioon oli varem M. Looritsa poolt kontrollitud. Antud ekspressioonivektorid transformeeriti BL21RIL rakkudesse sarnaselt peatükis 2.2.6 kirjeldatule. Sekveneerimistulemused kinnitasid, et kloneerimine oli toimunud vigadeta.

2.3.3 Valkude puhastamine suures mahus

pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ G386, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ S480, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ T412, pGEX-4T1 Δ 28 IRC3 Δ N482 ekspressioonivektoreid sisaldavad rakud koguti kokku ning lüüsi nagu on kirjeldatud peatükis 2.2.7.1 ning puhastati suures mahus sarnaselt peatükis 2.2.7.3 kirjeldatule.

GST- $\Delta 28$ Irc3 mutantseid valke sisaldavat rakulüsaat küllastati 30% ammooniumsulfaadi lõppkontsentratsioonini, et mitte uuritavad valgud välja soolata, edasiseks tööks koguti rakulüsaat. Rakusade lahustati 10 ml lüüsipuhvril SDS-PAGE analüüsiks. Rakulüsaat küllastati seejärel 60% ammooniumsulfaadi lõppkontsentratsioonini, et sadestada uuritavat valku sisaldav fraktsioon ning võeti supernatandist proov SDS PAGE analüüsiks. Uuritavad valku sisaldav sadestatud fraktsioon lahustati 10 ml lüüsipuhvri lahuses, lisati 0,5 ml GST FF maatriksit ning segati 2h *end-over-end*’il. Maatriks kanti kolonnile ning pesti EB puhvriga ning 1 M NaCl kontsentratsiooniga EB-ga, et eemaldada kolonnile olevad nukleinhapped ning pesti seejärel EB-ga kahes korduses. Järgmisena elueeriti kolonni 1 ml 10 mM glutatiooni sisaldava EB-ga kolmes korduses, mille käigus koguti GST- $\Delta 28$ Irc3 sisaldavad valgufraktsioonid

GST- $\Delta 28$ Irc3 valgult GST liitvalgu osa lõikamiseks valiti 10 mM glutatiooni sisaldusega EB-ga elueeritud esimene fraktsioon, mis sisaldas kõike suuremal määral uuritavat valku (Joonis 13).



Joonis 13. Valgu puhastamisel kogutud fraktsioonidest tehtud SDS-PAGE analüüs. M tähistab *Fermentas*’e suurusmarkerit. Punase ovaaliga on märgitud trombiiniga lõikuseks kasutatud fraktsiooni. Sup – Sonikeeritud ja tsentrifuugitud rakkude lüsaat, 30% - 30% ammooniumsulfaadi kontsentratsiooniga sadestatud ja 10 ml-s LB-s üles lahustatud valgufraktsioon, LO- pärast 60% ammooniumsulfaadiga sadestamist alles jäänud lüsaat, 60% - 60% ammooniumsulfaadiga sadestatud ja 10 ml-s LB-s üles lahustatud valgufraktsioon, W1 –

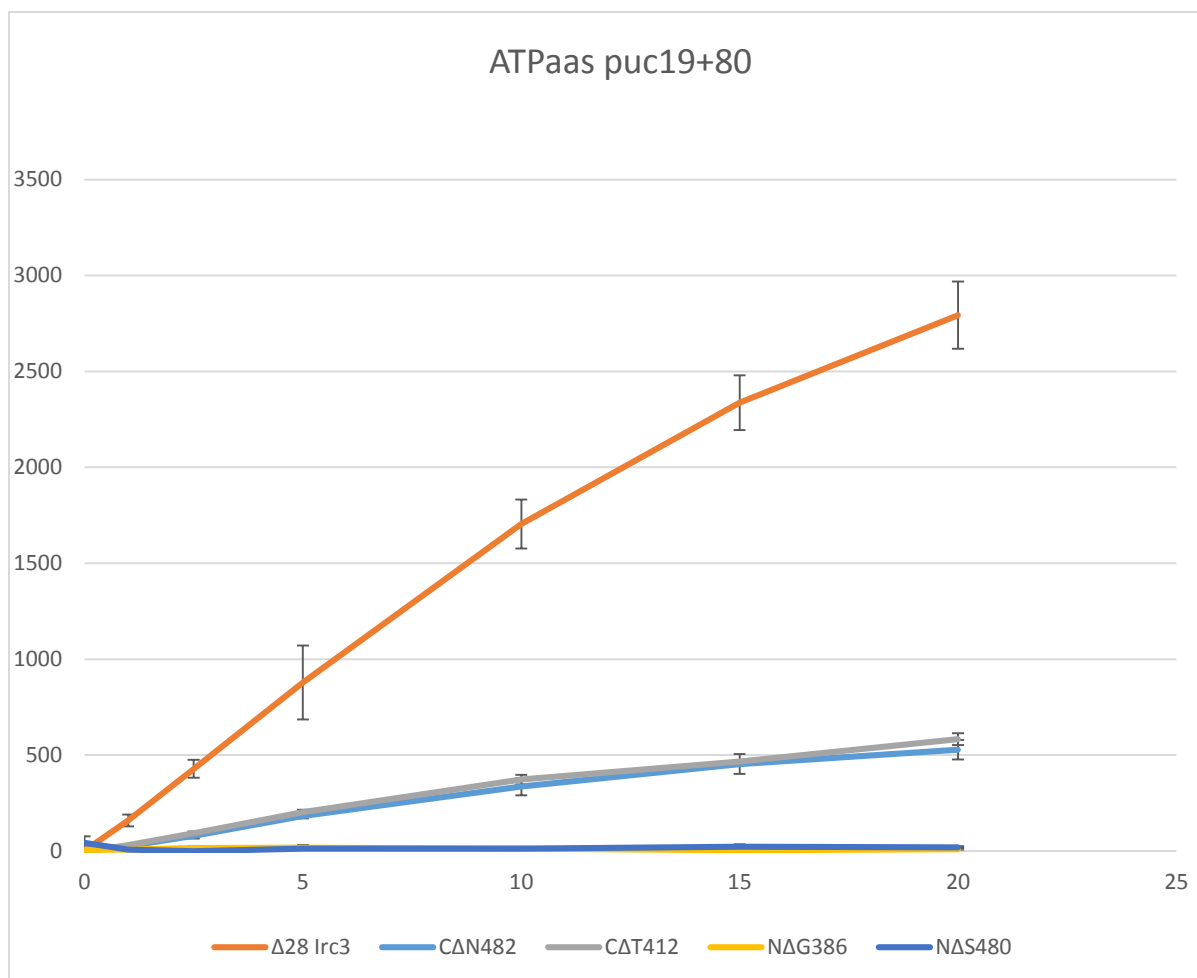
esimene pesu 5 ml EB-ga, E1 – esimene pesu 1 ml 10 mM glutatiooni sisaldusega EB-ga, E2 – teine pesu 1 ml 10 mM glutatiooni sisaldusega EB-ga, E3 – kolmas pesu 1 ml-i 10 mM glutatiooni sisaldusega EB-ga, *beads*-GST FF pärast valkude puhastamist.

Pärast GST- Δ Irc3 valkude lõikamist trombiiniga (kirjeldatud peatükis 2.2.7.3.1) lahjendati Irc3 uuritavaid valke sisaldavad fraktsioonid 100 mM NaCl lõppkontsentratsioonini ning kanti *S-sepharose* maatriksiga täidetud kolonnile ja pesti 200-600 mM NaCl sisaldusega S puhvritega 5 korda 100 μ l kaupa iga soolakontsentratsiooniga puhvriga (kirjeldatud peatükis 2.2.7.3.2). Pärast Bradfordi ja SDS-PAGE analüüsi koguti Δ 28 Irc3 mutante enim sisaldavad fraktsioonid (Lisa 1). Δ 28 Irc3 N Δ G386 valk - edaspidi märgistatud kui N Δ G386 – koguti kokku 250 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud viiendast fraktsioonist, 300 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud kõikidest fraktsioonidest ja 350 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud 1 fraktsioonist. Δ 28 Irc3 N Δ S480 valk - edaspidi märgistatud kui N Δ S480 – koguti kokku 350 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud kõigest 5 fraktsioonist ning 400 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud fraktsioonist 1 ja 2. Δ 28 Irc3 C Δ T412 valk - edaspidi märgistatud kui C Δ T412 – valk koguti kokku 250 mM NaCl S puhvriga elueeritud 3-5 fraktsioonist, 300 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud kõigest viiest fraktsioonist ning 350 mM NaCl sisaldusega S puhvriga elueeritud 1 fraktsioonist. Δ 28 Irc3 C Δ N482 valk - edaspidi märgistatud kui C Δ N482 – koguti kokku 300 mM NaCl sisaldusega S-puhvriga elueeritud viiest fraktsioonist. Seejärel mõõdeti *NanoDrop2000c* abil kogutud valgufraktsioonide valgu kontsentratsioon, mida kontrolliti SDS-PAGE abil ning külmutati seejärel säilitamiseks -80 °C juures. Pärast trombiiniga lõikust olid Δ 28 Irc3 mutantidel järgnevad molekulmassid ja pärast fraktsioonidest kokku kogumist järgnevad kontsentratsioonid: C Δ N482 51,2 kDa, 1,18 μ g/ μ l; C Δ T412 43,3 kDa, 0,792 μ g/ μ l; N Δ G386 34,8 kDa, 1,277 μ g/ μ l; N Δ S480 24,5 kDa, 0,7252 μ g/ μ l.

2.3.4 ATP hüdrolyüsamise aktiivsus

Irc3 valgu ATP hüdrolyüsamise aktiivsust mõjutavate domeenide uurimiseks teostati Δ 28 Irc3 mutantidega ATP hüdrolyüsamise aktiivsuse määramise katsed, referentsväärtuste saamiseks kasutati Δ 28 Irc3 valku (kirjeldatud peatükis 2.2.8.5). Substraadina puc 19+80 plasmidi kasutades oli Δ 28 Irc3 ~5 korda suurema ATPasse aktiivsusega, kui N-terminaalsed C Δ 482 ja C Δ 412 mutandid (Joonis 14), N Δ G386 ja N Δ S480 C-terminaalsetel valgumutantidel puudus taustamürast eristatav ATP hüdrolyüsamise aktiivsus. ATP hüdrolyüsamise aktiivsus oli kõikide ATP-d hüdrolyüsivate valgumutantide puhul sõltuv DNA olemasolust. Ilma DNA-

ta reaktsioonid ei stimuleerinud valgumutantide ATP hüdrolüüsamise aktiivsust, mis on näidatud graafikul (vt Lisa 2).



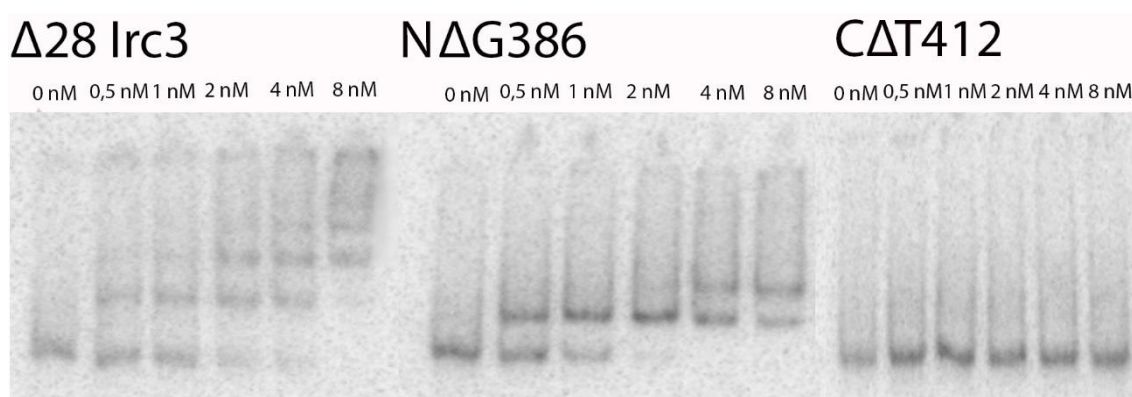
Joonis 14. $\Delta 28$ Irc3 mutantide poolt hüdrolüüsitud ATP pmol valgumolekulide kohta ajas. Y-teljel on kujutatud hüdrolüüsitud ATP moolide arv valgumutandi moolide kohta, X- teljel on katses kasutatud ajapunktid (0 min; 1 min; 2,5 min; 5 min; 10 min; 15 min ja 20 min). Graafikutele on välja toodud ka arvutatud standardhälbed iga ajapunkti kohta. $\Delta 482$ ja $\Delta 412$ mutant on väga sarnase ATP hüdrolüüsamise aktiivsusega. Reaktsioon sisaldas 0,331 pmol uuritavat valku ning 50 ng substraati. Katseid korrati vähemalt kolmes korduses.

2.3.5 DNA sidumisvõime

Valkude DNA sidumisvõime määramiseks teostati katsed sarnaselt peatükis 2.2.8.6 kirjeldatule, mille jaoks valmistati X_{12} substraat (sarnaselt peatükis 2.2.8.4 kirjeldatule), mis meenutab Holliday ühendust. Valkude DNA sidumisvõime uurimiseks valiti X_{12} substraat, sest Irc3 metsiktüüpi valguga tehtud katsed näitasid erinevate substraatidega katsete läbi viimisel kõige suuremat afiinsust just sellele substraadile (Gaidutšik jt., 2016). Valkude DNA

sidumisvõime uurimisel kasutati 2,5 nM substraati, mille tegemiseks lahjendati algselt valmistatud substraati TEN puhvril. Reaktsioonides kasutatavad valgulahjenduste lõppkontsentratsioonid olid 0 nM; 0,5 nM; 1 nM; 2 nM; 4 nM ja 8 nM.

Katsest selgus, et C-terminaalset $\Delta 28$ Irc3 valgu domeeni sisaldav mutant N Δ G386 sidus $\Delta 28$ Irc3 valguga võrdväärselt ja märgatavalt X₁₂ substraati, kuid N-terminaalset $\Delta 28$ Irc3 domeeni sisaldav mutant C Δ T412 mitte (Joonis 15). Ajanappuse tõttu analüüsiti ainult N Δ G386 ja C Δ T412 valgumutanti.



Joonis 15. $\Delta 28$ Irc3 valkude DNA sidumisvõime. Joonisel on näidatud analüüsitud valkude kontsentratsioonid ning nimed. Mida kõrgem valgu kontsentratsioon, seda enam $\Delta 28$ Irc3 valku ja Irc3 valgu C-terminaalset mutanti (N Δ G386) on X₁₂ substraadiga seondunud. N-terminaalne Irc3 valgumutant (C Δ T412) antud katsesüsteemis samas suurusjärgus substraati nähtavalt ei seo.

2.4 Arutelu

Töö eesmärk oli konstrueerida Irc3 valgu C-terminuse mutantide ekspressioonivektorid ning välja puhastada Irc3 valgu N- ja C-terminuse mutandid ja teostada nende biokeemilise aktiivsuse analüüs.

Loodud neljast C-terminuse mutantset valku sünteesivast ekspressioonivektorist õnnestus ainult kahega valku ekspresseerida. Seda võis põhjustada halvasti valitud $\Delta 28$ Irc3 N Δ V413 ja N Δ R435 N-terminaalsete aminohapete alguspunktid. Aminohapete deletsioonid valgu struktuuri määravates positsioonides võisid takistada Irc3 mutantide domeenide korrektset kokku pakkimist, mis võis viia nende lagundamiseni ekspressioonitüve poolt. Selleks, et paremini aru saada Irc3 valgu domeenide biokeemilistest rollidest lisati töösse N-terminaalset CAT412 ja CAN482 valgumutanti ekspresseerivad varasemalt loodud ekspressioonivektorid.

S-sepharose kolonnil valgufraktsioone puhastades elueerusid valgumutandid erineva NaCl kontsentratsiooni juures. See oli põhjustatud arvatavasti uuritavate valkude erinevast pinnalaengust ja aminohapete osakaalust, millest sõltusid valkude isoelektrilised punktid ning sellest tulenevalt ka soola kontsentratsioon, millega valgud elueeruvad. Puhastatud valgupreparaatide kontsentratsioonid jäid 0,7252-1,277 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vahele. Töös kasutati metsiktüüpi valgu puhastamise jaoks loodud tingimusi. Valkude efektiivsemaks puhastamiseks on võimalik iga mutandi jaoks erineva soolakontsentratsiooniga puhastusprotokoll välja töötada või optimeerida ekspressioonivektorit sisaldavate bakteritüvede kasvutingimusi.

Puhastatud valgumutantide biokeemilise aktiivsuse analüüsil ilmnnes, et Irc3 N- ja C-terminusel on teineteisest eraldiseisvad biokeemilised aktiivsused. Irc3 valgu N-terminaalsetel mutantidel on DNA poolt stimuleeritud ATP hüdrolüüsime võime, mis C-terminaalsetel mutantidel puudus. C-terminaalsel N Δ G386 mutandil on võime siduda Holliday ühendust meenutavat X_{12} substraati sarnase afiinsusega kui $\Delta 28$ Irc3. DNA sidumiskatsed ei näidanud märgatavat N-terminaalse CAT412 mutandi X_{12} substraadi sidumisvõimet. N-terminaalsete mutantide ATP hüdrolüüsime võime on stimuleeritud DNA poolt. Seda tõestasid ilma DNA-ta läbi viidud ATPasse aktiivsuse katsed. Järelikult N-terminaalsed mutandid siiski seovad DNA-d, kuid oluliselt väiksema afiinsusega. $\Delta 28$ Irc3 tervikliku valgu ATP hüdrolüüsime aktiivsus on ligi 5 korda suurem, kui N-terminaalsetel mutantidel. Sellest tulenevalt võib öelda, et C-terminaalne domeen suurendab mingil moel ATP hüdrolüüsime aktiivsust. Protsess toimub arvatavasti N-terminaalse valgudomeeni DNA sidumisvõime parandamise

kaudu. N-terminaalse Irc3 valgumutandi ATP hüdrolüüsamise võime on kooskõlas *in silicio* analüüsil avastatud seal leiduvate aminohapelliste motiivide funktsiooniga (de la Cruz jt., 1999; Szczesny jt., 2013). Irc3 valgu N-terminuses paiknevad motiivid, mille üldine funktsioon on ATP hüdrolüüsamise ja sidumisega seotud. Samuti leiduvad seal motiivid, mis interakteeruvad nukleinhapetega (Singleton jt., 2007; Fairman-Williams jt., 2010).

Tõenäoliselt on Irc3 C-terminaalne lisadomeen seotud spetsiifiliste DNA struktuuride seondamisega ning annab Irc3 valgule füsioloogilise spetsiifilisuse. Gaidutšik jt. on katsetega näidanud, et Irc3 seondub Holliday ühendusi ning erinevat tüüpi replikatsioonikahvleid meenutavate DNA struktuuridega. Samuti on ATP hüdrolüüsamise aktiivsus enim stimuleeritud HJ-t meenutavate substraatide poolt (Gaidutšik jt., 2016) NAG386 mutantne Irc3 valk sidus X₁₂ substraati, kuid CAT412 mitte. Sellest võib järeldada, et X₁₂ substraadiga seondumise spetsiifilisuse annab tõenäoliselt Irc3 valgule 386-689 aminohappe vahel paiknev domeen.

Irc3 valgu C-terminaalses domeenis võib paikneda ka teiste biokeemiliste aktiivsustega aladomeene, mis on omane DEAH/RHA helikaaside perekonnale ja ka mitmetele DEAD-box perekonna esindajatele. Seal paiknevad hüpoteetilised domeenid võivad osaleda Irc3 valgu füsioloogiliselt funktsionaalsesse valgukompleksi sidumisega või allosteerilises kontrollis.

Hiljutiste katsetega on näidatud, et Irc3 harutab lahti replikatsioonikahvleid meenutavaid struktuure ning osaleb Holliday ühenduste translokeerumises (*branch migration*) (Gaidutšik jt., 2016). Mitokondriaalse transpordisignaaliga bakteriaalne RecG valk on võimeline komplementeerima Irc3 kaotust, mis tähendab, et Irc3 võib täita sarnast rolli bakteriaalsete *branch migration*'is osalevate ensüümidega (Gaidutšik jt., 2016). RecG valgul on suurem N-terminaalne lisadomeen, *wedge* domeen, mis osaleb spetsiifiliste hargnenud DNA struktuuride (nende hulgas HJ ja replikatsiooni kahvleid meenutavad struktuurid) sidumises, stabiliseerimises ja lahti harutamises (Briggs jt., 2005; Bianco, 2015).

On võimalik, et Irc3 valgu C-terminaalne domeen on samuti *wedge* domeeniga samalaadse funktsiooniga. Edasiseks Irc3 valgu uurimiseks on kasulik määrata valgu kristallstruktuur seondununa erinevate DNA substraatide ja kofaktoritega. Kristallstruktuuri määramine annaks väga palju lisateadmisi Irc3 helikaasi töömehhanismide ning C-terminaalse lisadomeeni olulisuse kohta.

ATP hüdrolüüsamise aktiivsuse täpsemaks mõõtmiseks oleks võimalik kasutada malahiitrohelisel põhinevat ATP hüdrolüüsamise aktiivsuse määramise katset (Maleszka, 1977). Edasistes ATPasse aktiivsuse määramise töödes on oluline määrata Irc3 mutantide

katalüütilised kiiruskonstandid ning optimaalsed substraadi kontsentratsioonid. DNA sidumisvõime paremaks iseloomustuseks tuleb katsed läbi viia kolmes korduses ning kvantifitseerida DNA sidumisasiinsus.

Samuti võib anda valguga töömehhanismi kohta parema aimduse Irc3 valguga oligomerisatsiooni uurimine kas elektronmikroskoopiat või analüütilist tsentrifuugimist kasutades (Gell jt., 2012). Ühe molekuli reaalaja uuringud võivad anda aimdust helikaasi aktiivse või passiivse töömehhanismi kohta (Manosas jt., 2013). Irc3 valguga füsioloogilise tähtsuse määramiseks on ka oluline määrata võimalikud Irc3 valguga interaktsioonid teiste valkudega. Selleks võiks kasutada levinud immuunsadestamisel või 2D geelelektroforeesil ja mass-spektromeetriaal põhinevaid meetodeid või teisi uuenduslikke meetodeid (Carneiro jt., 2015). Irc3 valguga hüpoteetiliste interaktsioonide määramine annaks ka parema ettekujutluse Irc3 valguga *in vivo* tegelikust aktiivsusest, sest võimaldaks Irc3 valgu inhibeerivad ja aktiveerivad kofaktorid tuvastada. Seejärel oleks võimalik uurida nende individuaalset mõju Irc3 valguga aktiivsusele.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli konstrueerida Irc3 C-terminuse ekspressioonivektorid ning välja puhastada Irc3 valgu N- ja C-terminuse mutantsed valgud ja teostada nende biokeemilise aktiivsuse analüüs. Ekspressioonivektorite konstrueerimiseks kasutati pGEX-4T1 vektorit ning ekspressioonitüvena *E.coli* BL21RIL rakke. Töö käigus loodi 4 Irc3 C-terminaalset mutanti kodeerivat ekspressioonivektorit, kuid neist õnnestus valku ekspressirida vaid kahega.

See võis olla põhjustatud Irc3 mutantide domeenide ebakorrektselt kokku pakkimisest, mis võis viia valkude lagundamiseni ekspressioonitüve poolt. Selleks, et paremini aru saada Irc3 valgu domeenide biokeemilistest rollidest lisati töösse kaks N-terminaalset domeeni sisaldavat valgumutanti ekspresseerivat varasemalt loodud ekspressioonivektorit.

Irc3 valgud puhastati GST FF maatriksiga täidetud kolonnil, ning lõigati trombiiniga, et vabaneda GST liitvalgu osast ja puhastati täiendavalt *S-sepharose*'ga täidetud kolonni kasutades. Irc3 mutandid puhastusid erinevate soolakontsentratsioonidega, mis võis tuleneda valkude erinevast aminohapete osakaalust mõjutatud pinnalaengu või isoelektrilise punkti erinevusest. Puhastatud valkude kontsentratsioonid olid 0,7252-1,277 µg/µl.

Töö teises osas uuriti valgumutantide biokeemilisi aktiivsusi. ATP hüdroolüüsamise aktiivsuse uurimisel selgus, et Irc3 valgu N-terminaalsetel mutantidel on DNA poolt stimuleeritud ATP hüdroolüüsamise aktiivsus, mis C-terminaalsetel Irc3 mutantidel puudus. See oli kooskõlas varasemalt *in silico* tehtud analüüsil Irc3 valgu N-terminaalsest domeenist leitud aminohapelite motiivide funktsioonidega.

DNA sidumisvõimet uuriti ajanappuse tõttu ainult kahe Irc3 valgumutandiga. Nendeks valiti Irc3 valgu C-terminuse mutant NΔG386 ning N-terminuse mutant CΔT412. Katsetest selgus, et C-terminuse mutant NΔG386 sidus katses kasutatud Holliday struktuuri meenutavat substraati sarnase efektiivsusega nagu võrdlusena kasutatud Δ28 Irc3 valk. CΔT412 valgumutant samas suurusjärgus märgatavalt DNA-d ei sidunud, kuigi CΔT412 valgumutandi ATP hüdroolüüsamise aktiivsus on stimuleeritud DNA poolt. Sellest järeldus, et CΔT412 mutant seob DNA-d oluliselt väiksema afiinsusega, kui C-terminuse mutant. Tööst selgus, et Irc3 valgu võime seonduda spetsiifiliste Holliday struktuuri meenutavate substraatidega on tõenäoliselt seotud Irc3 valgu 386 ja 689 aminohappe vahel paikneva C-terminaalse domeeniga.

Functional analysis of the N- and C-terminal domains of the recombinative helicase Irc3

Joosep Paats

Summary

Mitochondria are eukaryotic organelles required for aerobic respiration, energy production, and for a number of other processes in the cell. Only 1% of the mitochondrial proteins are encoded by the mitochondrial genome. The other proteins are encoded by the nuclear genome and are post-translationally imported into mitochondria. Mitochondrial DNA is packed into DNA-protein assemblies called nucleoids. Mitochondrial DNA encodes number of respiratory chain peptides essential to the functioning of the respiratory chain. Proteins encoded by the nuclear genome are involved in the maintenance of the mitochondrial genome and are necessary for other mitochondrial functions. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a widely used model organism for studying mitochondria. The nuclear genome of *S. cerevisiae* encodes 4 DExH/D family helicases, Mss116, Suv3, Mrh4, and Irc3 that have a direct role in mitochondrial DNA maintenance or mitochondrial gene expression.

Helicases are nucleic acid-dependent ATPases that unwind double-stranded nucleic acids and are involved in almost all processes that are related to nucleic acid metabolism. Irc3 of the budding yeast *S. cerevisiae* is a DExH/D-box family DNA helicase that has a direct role in mitochondrial DNA maintenance. In *irc3* Δ mutant yeast strains, specific double-stranded ends or breaks in mtDNA accumulate and the yeast cells lose their respiratory competence.

The aim of this paper was to study the biochemical functions of Irc3 N- and C-terminal domains. For that purpose, four C-terminal specific expression vectors were constructed using pGEX-4T1 cloning vector and transformed to the *E. coli* BL21RIL strain. The expression of proteins was successful with two Irc3 C-mutants, N Δ G386 and N Δ S480. Unsuccessful protein expression of two C-terminal mutants might be related with incorrect protein domain folding and the misfolded proteins might have been subjected to proteolysis by the BL21RIL strain. In addition, to study the Irc3p N- terminal domains, two previously constructed and controlled expression vectors that encoded C Δ T412 and C Δ N482 mutant proteins were used. Glutathione Sepharose fast flow column was used to purify the recombinant proteins. The GST tag of the recombinant protein was cut with thrombin followed by purification with the S-Sepharose fast flow column. Subsequently, the concentrations of proteins were determined and biochemical studies were conducted.

Biochemical analysis of the Irc3 mutants showed that the N-terminal mutants (CΔT412 and CΔN482) had DNA stimulated ATPase activity while the C-terminal mutants (NΔG386 and NΔS480) did not. Previously conducted *in silico* study had shown that motifs that are related with ATP binding, hydrolysis, and with nucleic acid binding are in the N-terminal part of the Irc3 helicase. Analysis of DNA binding by the Irc3 mutants showed that the N-terminal part (CΔT412) did not bind DNA in our assay system and the C-terminal part (NΔG386) had approximately same affinity for the substrate DNA as the full-length Δ28 Irc protein.

Recent studies of the full length wild type Irc3 protein showed high affinity for Holliday junction-like substrate binding and stimulated ATPase activity. Irc3 can also unwind replication fork like substrates and branch migrate Holliday junctions. It has been shown that mitochondrially targeted bacterial helicase RecG can complement the loss of Irc3. RecG is a branch migration enzyme and has an N-terminal wedge domain that binds the replication fork and Holiday junction like DNA substrates. That in mind, the C-terminal domain of Irc3 helicase might have a similar function with the wedge domain of RecG.

KIRJANDUSE LOETELU

Abdel-Monem M. and Hoffmann-Berling H. (1976b). 2. Chain Separation by an ATP-Dependent DNA Unwinding Enzyme. *Eur. J. Biochem.* 65: 441-449.

Abdel-Monem Mahmoud and Hoffmann-Berling Hartmut (1976a). 1. Purification and Characterization of a DNA-Dependent ATPase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 65, 431-440.

Alvaro D., Lisby M., Rothstein R. (2007). Genome-wide analysis of Rad52 foci reveals diverse mechanisms impacting recombination. *PLoS Genet.* 3(12): e228.

Becker T., Gebert M., Pfanner N., van der Laan M. (2009). Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* (4):484-93.

Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M, Hannon G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409: 363-366.

Bertani G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 62: 293-300.

Bhattacharyya B. and KeckBohr J.L. (2008). Grip it and rip it: Structural mechanisms of DNA helicase substrate binding and unwinding. *Protein Sci.* 23(11):1498-507.

Bianco P.R. (2015). I came to a fork in the DNA and there was RecG. *Prog Biophys Mol Biol.* 117(2-3):166-73.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Briggs G.S., Mahdi A.A., Wen Q., Lloyd R.G. (2005). DNA binding by the substrate specificity (wedge) domain of RecG helicase suggests a role in processivity. *J Biol Chem.* 280(14):13921-7.

Büttner K., Nehring S., Hopfner K.P. (2007). Structural basis for DNA duplex separation by a

Byrd A.K. and Raney K.D. (2013). Superfamily 2 helicases. *Front Biosci (Landmark Ed).* 17:2070–2088.

Carneiro D.G., Clarke T., Davies C.C., Bailey D. (2016). Identifying novel protein interactions: Proteomic methods, optimisation approaches and data analysis pipelines. *Methods.* 295:46-54.

- Chen X.J. and Butow R.A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 6(11):815-25.
- Clapier C.R. and Cairns B.R. (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes *Annu. Rev. Biochem.* 78:273–304.
- Coin F., Marinoni J.C., Rodolfo C., Fribourg S., Pedrini A.M., Egly J.M. (1998). Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet.* 20(2):184-8.
- Cui S., Eisenächer K., Kirchhofer A., Brzózka K., Lammens A., Lammens K., Fujita T., Conzelmann K.K., Krug A., Hopfner K.P. (2008). *Mol Cell.* 29(2):169-79.
- de la Cruz J., Kressler D., Linder P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci.* 24(5):192-8.
- de la Cruz J., Kressler D., Tollervey D., Linder P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17(4):1128-40.
- de Zamaroczy M., Faugeron-Fonty G., Baldacci G., Goursot R., Bernardi G. (1984). The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene.* 32(3):439-57.
- Del Campo M., Lambowitz A.M. (2009). Structure of the Yeast DEAD-Box Protein Mss116p Reveals Two Wedges that Crimp RNA. *Mol Cell.* 35(5): 598–609.
- Delagoutte E. and von Hippel P.H. (2003). Helicase mechanisms and the coupling of helicases within macromolecular machines. Part II: Integration of helicases into cellular processes. *Q Rev Biophys* 36(1):1-69.
- Dziembowski A., Piwowarski J., Hoser R., Minczuk M., Dmochowska A., Siep M., van der Spek H., Grivell L., Stepień P.P. (2003). *J Biol Chem.* 278(3):1603-11.
- Dürr H., Körner C., Müller M., Hickmann V., Hopfner K.P. (2005). X-Ray Structures of the *Sulfolobus solfataricus* SWI2/SNF2 ATPase Core and Its Complex with DNA. *Cell.* 121(3):363-73.
- Ephrussi B., de Margerie-Hottinguer H., Roman H. (1955). SUPPRESSIVENESS: A NEW FACTOR IN THE GENETIC DETERMINISM OF THE SYNTHESIS OF RESPIRATORY ENZYMES IN YEAST. *Proc Natl Acad Sci.* 41(12):1065-71.

- Fairman-Williams M.E., Guenther U.P., Jankowsky E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol.* (3):313-24.
- Fan L., Fuss J.O., Cheng Q.J., Arvai A.S., Hammel M., Roberts V.A., Cooper P.K., Tainer J.A. (2008). XPD helicase structures and activities: insights into the cancer and aging phenotypes from XPD mutations. *Cell.* 133(5):789-800.
- Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440(3):325-31.
- Fujita T., Onoguchi K., Onomoto K., Hirai R., Yoneyama M. (2007). Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie.* 89(6-7):754-60.
- Fuller-Pace F.V. (2006). DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 34(15):4206-15.
- functions? *HFSP J.* 3(3):153-64.
- Gaidutšik I., Sedman T., Sillamaa S., Sedman J. (2016). Irc3 is a mitochondrial DNA branch migration enzyme. *Sci Rep.* 6:26414.
- Gatfield D., Le Hir H., Schmitt C., Braun I.C., Köcher T., Wilm M., Izaurralde E. (2001). The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr Biol.* 11(21):1716-21.
- Geider, K., Berthold, V., Abdel-Monem, M., Hoffmann-Berling, H. (1978). Control of DNA Structure by Proteins. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America, 08, jan. 1978.
- Gell D.A., Grant R.P., Mackay J.P. (2012). The detection and quantitation of protein oligomerization. *Adv Exp Med Biol.* 747:19-41.
- Gorbalenya A.E. and Koonin E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:419-429.
- Grifo J.A., Abramson R.D., Satler C.A., Merrick W.C (1984). RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem.* 259(13):8648-54.
- Haaf T., Raderschall E., Reddy G., Ward D.C., Radding C.M., Golub E.I. (1999). *J Cell Biol.* 144(1):11-20.
- Henze K. and Martin W. (2003). Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature.* 426(6963):127-8.

- Holub P., Lalakova J., Cerna H., Pasulka J., Sarazova M., Hrazdilova K., Arce M.S., Hobor F., Stefl R., Vanacova S. (2012). Air2p is critical for the assembly and RNA-binding of the TRAMP complex and the KOW domain of Mtr4p is crucial for exosome activation. *Nucleic Acids Res* 40(12):5679-93.
- Hotta Y. and Stern H. (1978). DNA unwinding protein from meiotic cells of *Lilium*. *Biochemistry*. 17(10):1872-80.
- Huang S., Li B., Gray M.D., Oshima J., Mian I.S., Campisi J. (1998). *Nat Genet*. 20(2):114-6.
- Huber M.D., Duquette M.L., Shiels J.C., Maizels N. A. (2006). A conserved G4 DNA binding domain in RecQ family helicases. *J Mol Biol*. 358(4):1071-80.
- Huh W.K., Falvo J.V., Gerke L.C., Carroll A.S., Howson R.W., Weissman J.S., O'Shea E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 425(6959):686-91.
- Hönig A., Auboeuf D., Parker M.M., O'Malley B.W., Berget S.M. (2002). Regulation of Alternative Splicing by the ATP-Dependent DEAD-Box RNA Helicase p72. *Mol Cell Biol*. 22(16):5698-707.
- Iost I., Dreyfus M., Linder P. (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem*. 274(25):17677-83.
- Jackson R.N., Klauer A.A., Hintze B.J., Robinson H., van Hoof A., Johnson S.J. (2010). The crystal structure of Mtr4 reveals a novel arch domain required for rRNA processing. *EMBO J*. 29(13):2205-16.
- Kakar S., Fang X., Lubkowska L., Zhou Y.N., Shaw G.X., Wang Y.X., Jin D.J., Kashlev M., Ji X. (2015). Allosteric Activation of Bacterial Swi2/Snf2 (Switch/Sucrose Non-fermentable) Protein RapA by RNA Polymerase: BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL STUDIES. *J Biol Chem*. 290(39):23656-69.
- Kassabov S.R., Zhang B., Persinger J., Bartholomew B. (2003). SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome. *Mol Cell*. 11(2):391-403.
- Kasten M.M., Clapier C.R., Cairns B.R. (2011). SnapShot: Chromatin Remodeling: SWI/SNF. *Cell*. 144(2):310.e1.
- Kim J.L., Morgenstern K.A., Griffith J.P., Dwyer M.D., Thomson J.A., Murcko M.A., Lin C., Caron P.R. (1998). Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound

oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6(1):89-100.

Kitano K., Kim S.Y., Hakoshima T. (2010). Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN. *Structure*. 18(2):177-87.

Klostermeier D., Rudolph M.G. (2009). A novel dimerization motif in the C-terminal domain of the *Thermus thermophilus* DEAD box helicase Hera confers substantial flexibility. *Nucleic Acids Res.* 37(2):421-30.

Kuusk S., Sedman T., Sedman J. (2002). Recombinant yeast mtDNA helicases. Purification and functional assays. *Methods Mol Biol.* 197:303-16.

Kümmerer B.M., Rice C.M. (2002). Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* 76(10):4773-84.

Lapkouski ., Panjikar S., Janscak P., Smatanova I.K., Carey J., Ettrich R., Csefalvay E. (2009). Structure of the motor subunit of type I restriction-modification complex EcoR124I. *Nat Struct Mol Biol.* 16(1):94-5.

LeBowitz J.H., McMacken R. (1986). The *Escherichia coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem.* 261(10):4738-48.

Leitão A.L., Costa M.C., Enguita F.J. (2015). Unzippers, resolvers and sensors: a structural and functional biochemistry tale of RNA helicases. *Int. J. Mol. Sci.* 2269-2293.

Linder P. (2003). Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol Cell.* 95(3-4):157-67.

Lionnet T., Spiering M.M., Benkovic S.J., Bensimon D., Croquette V. (2007). Real-time observation of bacteriophage T4 gp41 helicase reveals an unwinding mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(50):19790-5.

Lisby M., Mortensen U.H., Rothstein R. (2003). Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol.* 5:572–577.

Lisby M., Rothstein R. (2005). Localization of checkpoint and repair proteins in eukaryotes. *Biochimie.* 87: 579–589.

Liu W.J., Sedlak P.L., Kondratieva N., Khromykh A.A. (2002). Complementation analysis of the flavivirus Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for

formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 in cis for virus assembly. *J Virol.* 76(21):10766-75.

Lohman T.M. (1993). Helicase-catalyzed DNA Unwinding. *J Biol Chem.* 268(4):2269-72.

Lucic B., Zhang Y., King O., Mendoza-Maldonado R., Berti M., Niesen F.H., Burgess-Brown N.A., Pike A.C., Cooper C.D., Gileadi O., Vindigni A. (2011). A prominent β -hairpin structure in the winged-helix domain of RECQ1 is required for DNA unwinding and oligomer formation. *Nucleic Acids Res.* 39(5):1703-17.

Macrae I.J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A.N., Cande W.Z., Adams P.D., Doudna J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science.* 311(5758):195-8.

Maleszka R., Skelly P.J., Clark-Walker G.D. (1991). Rolling circle replication of DNA in yeast mitochondria. *EMBO J.* 10(12):3923-9.

Manosas M., Perumal S.K., Bianco P.R., Ritort F., Benkovic S.J., Croquette V. (2013). RecG and UvsW catalyse robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. *Nat Commun.* 4:2368.

Manosas M., Perumal S.K., Bianco P.R., Ritort F., Benkovic S.J., Croquette V. (2014). RecG and UvsW catalyse robust DNA rewinding critical for stalled DNA replication fork rescue. *Nat Commun.* 5:4210.

Manosas M., Xi X.G., Bensimon D., Croquette V. (2010). Active and passive mechanisms of helicases. *Nucleic Acids Res.* 38(16):5518-26.

Markland W., Petrillo R.A., Fitzgibbon M., Fox T., McCarrick R., McQuaid T., Fulghum J.R., Chen W., Fleming M.A., Thomson J.A., Chambers S.P. (1997). Purification and characterization of the NS3 serine protease domain of hepatitis C virus expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol.* 78 (Pt 1):39-43.

Matson S.W., Tabor S., Richardson C.C. (1983). The gene 4 protein of bacteriophage T7. Characterization of helicase activity. *J Biol Chem.* 258(22):14017-24.

McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 16: R551-560.

McGlynn P. and Lloyd R.G. (2002). Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(11):859-70.

- Mizukoshi T., Tanaka T., Arai K., Kohda D., Masai H. (2003). A critical role of the 3' terminus of nascent DNA chains in recognition of stalled replication forks. *J Biol Chem.* 278(43):42234-9.
- Mohrmann L., Verrijzer C.P. (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1681(2-3):59-73.
- Muftuoglu M., Kulikowicz T., Beck G., Lee J.W., Piotrowski J, Bohr V.A. (2008). Intrinsic ssDNA annealing activity in the C-terminal region of WRN. *Biochemistry.* 47(39):10247-54.
- Murray N.E. (2000). Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(2):412-34.
- Muszbek L., Szabó T., Fésüs L. (1977). A high sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Anal Biochem.* 77(1):286-8.
- Muzzolini L., Beuron F., Patwardhan A., Popuri V., Cui S., Niccolini B., Rappas M., Freemont P.S., Vindigni A. (2007). Different quaternary structures of human RECQ1 are associated with its dual enzymatic activity. *PLoS Biol.* 5(2):e20.
- Neumann B., Wu H., Hackmann A., Krebber H. (2016). Nuclear Export of Pre-Ribosomal Subunits Requires Dbp5, but Not as an RNA-Helicase as for mRNA Export. *PLoS One.* 11(2):e0149571.
- Newmeyer D.D., Ferguson-Miller S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 112(4):481-90.
- Pena V., Jovin S.M., Fabrizio P., Orłowski J., Bujnicki J.M., Lührmann R., Wahl M.C. (2009). Common design principles in the spliceosomal RNA helicase Brr2 and in the Hel308 DNA helicase. *Mol Cell.* 35(4):454-66.
- Perry J.J., Yannoni S.M., Holden L.G., Hitomi C., Asaithamby A., Han S., Cooper P.K., Chen D.J., Tainer J.A. (2009). WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Nat Struct Mol Biol.* 13(5):414-22.
- Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G.N., Nielsen, J. (2010). Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res.* 10:1046-1059.

- Pike A.C., Shrestha B., Popuri V., Burgess-Brown N., Muzzolini L., Costantini S., Vindigni A., Gileadi O. (2009). Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(4):1039-44.
- Popuri V., Bachrati C.Z., Muzzolini L., Mosedale G., Costantini S., Giacomini E., Hickson I.D., Vindigni A. (2008). The Human RecQ helicases, BLM and RECQ1, display distinct DNA substrate specificities. *J Biol Chem*. 283(26):17766-76.
- Raderschall E., Golub E., Haaf T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(5):1921-6.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Liquid media for E.coli, p. A2.4. In J. Sambrook and D. W. Russell (ed.), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol.3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Sandoval E., Diaz-Quezada C., Velazquez G., Arroyo-Navarro L.F., Almanza-Martinez N., Trasviña-Arenas C.H., Briebe L.G. (2015). Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences. *Mitochondrion*. 24:22-31.
- Scheffner M., Knippers R., Stahl H. (1989). RNA unwinding activity of SV40 large T antigen. *Cell*. 57(6):955-63.
- Schmid S.R., Linder P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol*. 6(3):283-91.
- Schmidt O., Pfanner N., Meisinger C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(9):655-67.
- Sedman T., Gaidutšik I., Villemson K., Hou Y., Sedman J. (2014). Double-stranded DNA-dependent ATPase Irc3p is directly involved in mitochondrial genome maintenance. *Nucleic Acids Res*. 42(21):13214-27.
- Shaw G., Gan J., Zhou Y.N., Zhi H., Subburaman P., Zhang R., Joachimiak A., Jin D.J., Ji X. (2008). Structure of RapA, a Swi2/Snf2 protein that recycles RNA polymerase during transcription. *Structure*. 16(9):1417-27.
- Shiratori A., Shibata T., Arisawa M., Hanaoka F., Murakami Y., Eki T. (1999). Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode

novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast*. 15(3):219-53.

Singleton M.R., Dillingham M.S., Wigley D.B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem*. 76:23-50.

Singleton M.R., Sawaya M.R., Ellenberger T., Wigley D.B. (2000). Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell*. 101(6):589-600.

Smeitink J., van den Heuvel L., DiMauro S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet*. 2(5):342-52.

Szczesny, R.J., Wojcik, M.A., Borowski, L.S., Szewczyk, M.J., Skorok, M.M., Golik, P., Stepień, P.P., (2013). Yeast and human mitochondrial helicases. *Biochim Biophys Acta* 829(8):842-53.

Staley J.P., Guthrie C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*. 92(3):315-26.

Stross C., Shimakami T., Haselow K., Ahmad M.Q., Zeuzem S., Lange C.M., Welsch C. (2016). Natural HCV variants with increased replicative fitness due to NS3 helicase mutations in the C-terminal helix $\alpha 18$. *Sci Rep*. 6:19526.

Subramanya H.S., Bird L.E., Brannigan J.A., Wigley D.B. (1996). Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature*.;384(6607):379-83.

superfamily-2 helicase. *Nat Struct Mol Biol*. 14(7):647-52.

Zhang J., Vemuri G., Nielsen J. (2010). Systems biology of energy homeostasis in yeast. *Curr Opin Microbiol*. 13(3):382-8.

Zhang Y., Smith C.L., Saha A., Grill S.W., Mihardja S., Smith S.B., Cairns B.R., Peterson C.L., Bustamante C. (2006). DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell*. 24(4):559-68.

Tanaka N., Schwer B. (2006). Mutations in PRP43 that uncouple RNA-dependent NTPase activity and pre-mRNA splicing function. *Biochemistry* 45(20):6510-21.

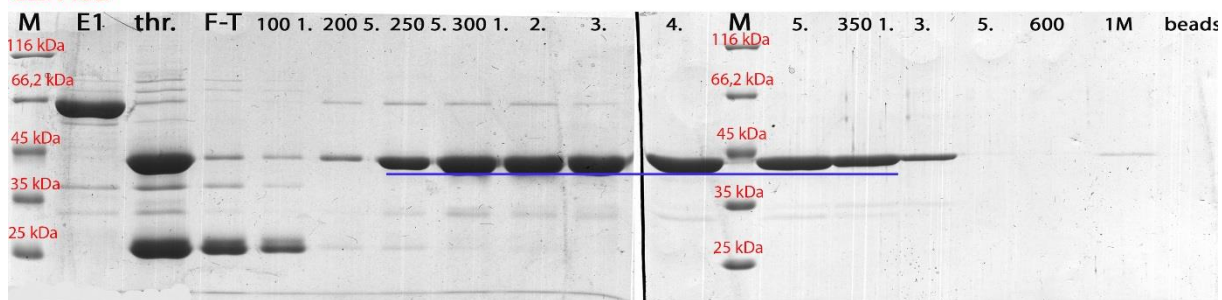
Taylor A.F., Smith G.R., (1985). Substrate specificity of the DNA unwinding activity of the RecBC enzyme of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 185(2):431-43.

- Thömmes P. and Hübscher A. (1990). Eukaryotic DNA replication. Enzymes and proteins acting at the fork. *Eur J Biochem.* 194(3):699-712.
- Tzagoloff A. and Myers A.M. (1986). Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem.* 55:249-85.
- Tuteja N. and Tuteja R. (2004a). Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur J Biochem.* 271(10):1835-48.
- Tuteja N. and Tuteja R. (2004b). Unraveling DNA helicases. Motif, structure, mechanism and function. *Eur J Biochem.* 271(15):3283.
- Umate P., Tuteja N., Tuteja R. (2011). Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. *Commun Integr Biol.* 4(1):118-37.
- Umate P., Tuteja R., Tuteja N. (2010). Genome-wide analysis of helicase gene family from rice and Arabidopsis: a comparison with yeast and human. *Plant Mol Biol.* 73(4-5):449-65.
- Upton A.L., Grove J.I., Mahdi A.A., Briggs G.S., Milner D.S., Rudolph C.J., Lloyd R.G. (2014). Cellular location and activity of Escherichia coli RecG proteins shed light on the function of its structurally unresolved C-terminus. *Nucleic Acids Res.* 42(9):5702-14.
- Usaitė R., Jewett M.C., Oliveira A.P., Yates J.R., Olsson L., Nielsen J. (2009) Reconstruction of the yeast Snf1 kinase regulatory network reveals its role as a global energy regulator. *Mol Syst Biol* 5: 319Walbott jt., 2010
- Wang S., Hu Y., Overgaard M.T., Karginov F.V., Uhlenbeck O.C., McKay D.B. (2006). The domain of the Bacillus subtilis DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding of 23S rRNA has an RNA recognition motif fold. *RNA.* 12(6):959-67.
- Velankar S.S., Soultanas P., Dillingham M.S., Subramanya H.S., Wigley D.B. (1999). Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell.* 97(1):75-84.
- Williamson D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet* 3(6):475-81.
- Vindigni A. and Hickson I. D (2009). RecQ helicases: multiple structures for multiple
- Vlachakis D., Koumandou V.L., Kossida S. (2013). A holistic evolutionary and structural study of flaviviridae provides insights into the function and inhibition of HCV helicase. *PeerJ.* 1:e74.

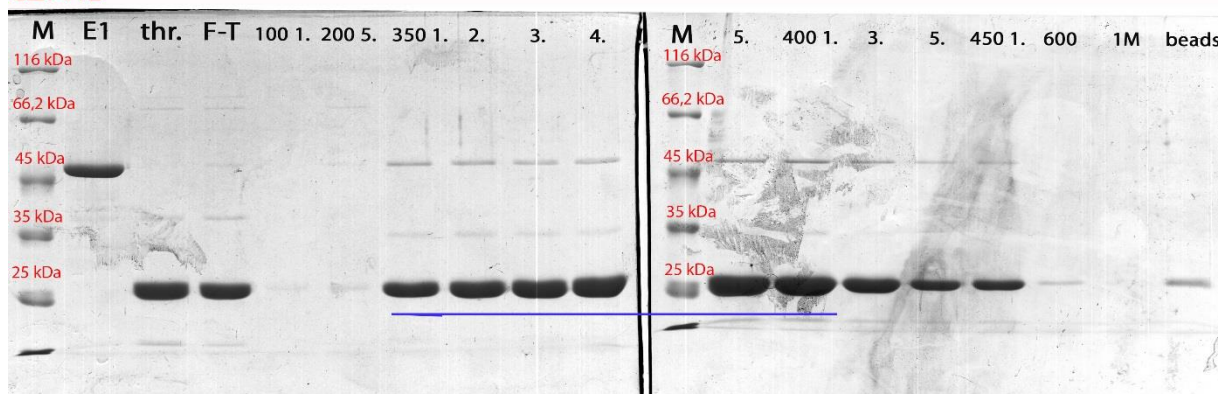
- von Kobbe C., Thoma N.H., Czyzewski B.K., Pavletich N.P., and Bohr V.A. (2003). Werner syndrome protein contains three structure-specific DNA binding domains. *J. Biol. Chem.* 278(52): 52997–53006.
- Wu Y. (2012). Unwinding and Rewinding: Double Faces of Helicase? *J Nucleic Acids.* 2012:140601.
- Wu Y., Suhasini A.N., Brosh R.M. Jr. (2009). Welcome the family of FANCDJ-like helicases to the block of genome stability maintenance proteins. *Cell Mol Life Sci.* 66(7):1209-22.
- Xie P. (2016). Dynamics of monomeric and hexameric helicases. *Biophys Chem.* 211:49-58.
- Xiol J., Spinelli P., Laussmann M.A., Homolka D., Yang Z., Cora E., Couté Y., Conn S., Kadlec J., Sachidanandam R4., Kaksonen M., Cusack S., Ephrussi A., Pillai R.S. (2014). RNA clamping by Vasa assembles a piRNA amplifier complex on transposon transcripts. *Cell.* 157(7):1698-711.
- Yang Q., Del Campo M., Lambowitz A.M., Jankowsky E. (2007). DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Mol Cell.* 26;28(2):253-63.
- Yang Q., Jankowsky E. (2006). The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. *Nat Struct Mol Biol.* 13(11):981-6.
- Yusufzai T. and Kadonaga J.T. (2008). HARP Is an ATP-driven Annealing Helicase. *Science.* 322(5902): 748–750.

LISAD

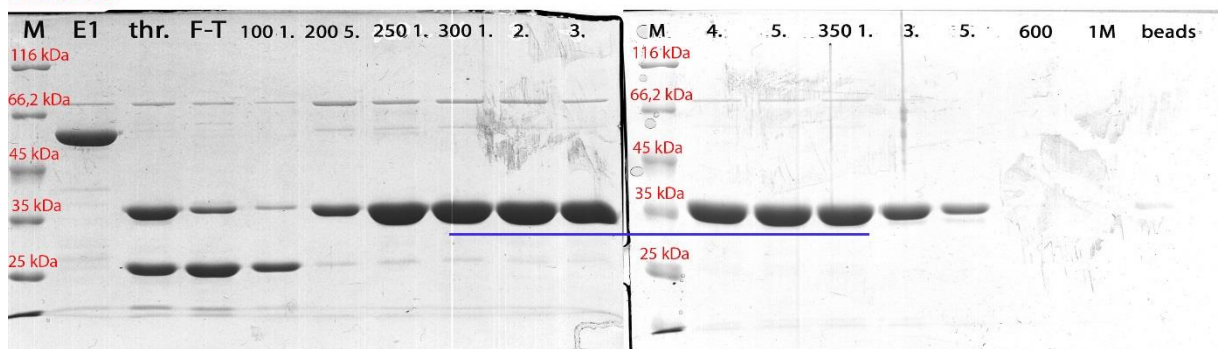
CAN482



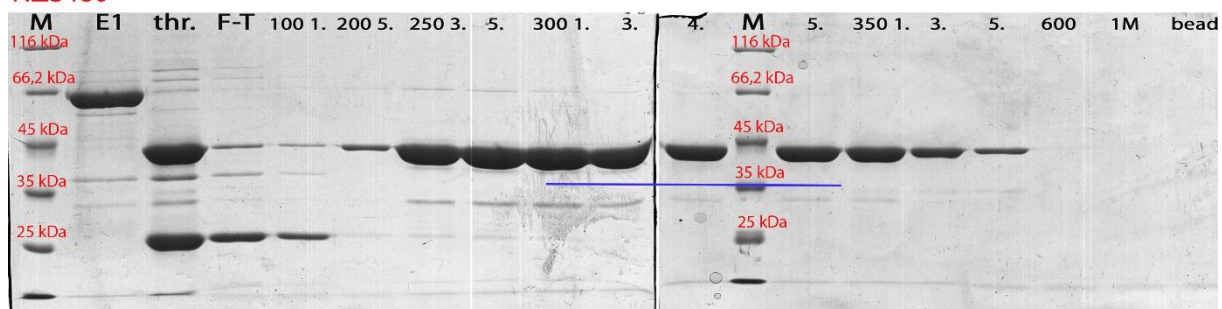
CAT412



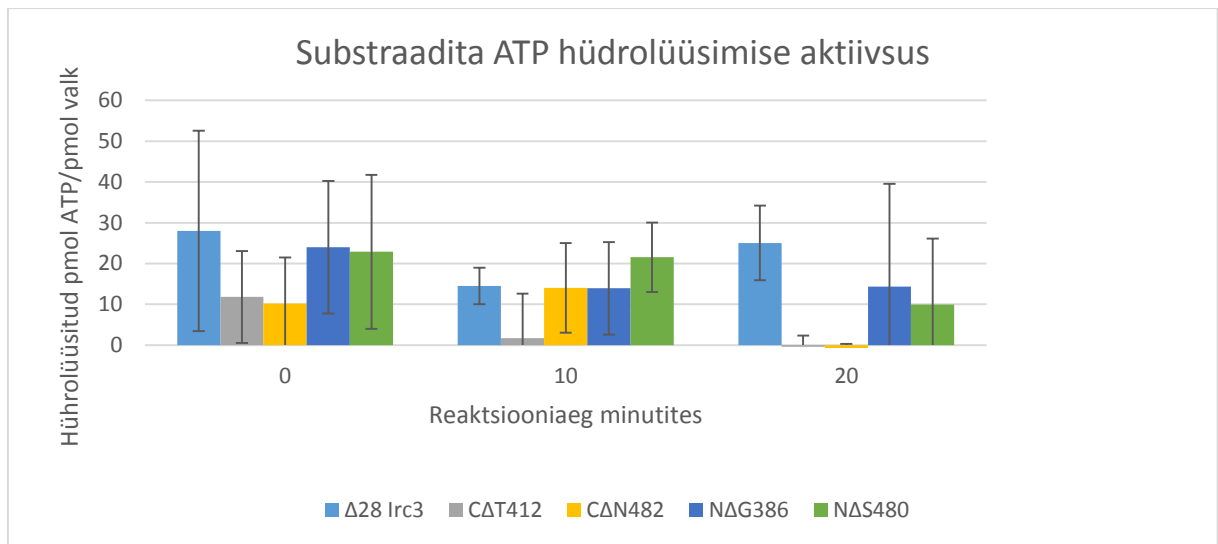
NAG386



NAS480



LISA 1. Valgupuhastamise efektiivsuse hindamine SDS-PAGE abil. M tähistab *Fermentas* suurusmarkerit. E1- trombiiniga lõikuseks kasutatud valgufraktsiooni. thr- valgud pärast trombiiniga lõikust, 25 kDa juures on näha lõigatud GST liitvalgu osa. F-T- *flow through* ehk pärast valgu kandmist S-sepharose kolonnile läbi voolanud fraktsioon. Sinise joonega on alla joonitud märgitud soolakontsentratsiooniga kokku kogutud valgufraktsioonid, mida kasutati valkude aktiivsuste määramisel.



LISA 2. ATPaasse aktiivsus ilma DNA substraadita. Graafikult on näha, et ilma DNA substraadita ei ole valgumutantide ATP hüdrolüüsimise aktiivsus stimuleeritud. Graafikule on märgitud hüdrolüüsitud ATP standardhälbed iga ajapunkti kohta.

Lihtlitsents

Lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Joosep Paats (sünnikuupäev: 26. mai 1994),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Rekombinatiivse helikaasi Irc3 C- ja N-terminaalsete domeenide funktsioonide analüüs,

mille juhendajad on M.Sc Ilja Gaidutšik, prof. Juhan Sedman

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.20.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016